



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Instituto de Biologia

**Desenvolvimento de formulação farmacêutica para uso tópico:
responsividade de linhagens celulares de melanoma humano.**

**Development of pharmaceutical formulation for topical
administration : responsiveness of human melanoma cell lines.**

Campinas 2017

Marina Pereira Dias

**Desenvolvimento de formulação farmacêutica para uso tópico:
responsividade de linhagens celulares de melanoma humano.**

**Development of pharmaceutical formulation for topical
administration : responsiveness of human melanoma cell lines.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Funcional e Molecular na área de
Bioquímica.*

*Dissertation presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Master in Functional
and Molecular Biology in the field of Biochemistry.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA PEREIRA
DIAS E ORIENTADA PELA PROF^a. DRA.
CARMEN VERÍSSIMA FERREIRA-HALDER.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CARMEN VERÍSSIMA FERREIRA-HALDER

Campinas 2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2015/01138-1

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia

Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D543d

Dias, Marina Pereira, 1985-
Desenvolvimento de formulação farmacêutica para uso tópico:
responsividade de linhagens celulares de melanoma humano / Marina Pereira
Dias. – Campinas, SP: [s.n.], 2017.

Orientador: Carmen Veríssima Ferreira-Halder.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Melanoma. 2. Riboflavina. 3. Poloxâmero. 4. Resistência a
medicamentos. I. Ferreira, Carmen Veríssima, 1969-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of pharmaceutical formulation for topical
administration : responsiveness of human melanoma cell lines.

Palavras-chave em inglês:

Melanoma

Riboflavin

Poloxamer

Drug resistance

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carmen Veríssima Ferreira-Halder [Orientador]

Silvy Stuchi Maria-Engler

Adair Vieira Junior

Data de defesa: 30-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 30 de Março de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Dra Carmen Veríssima Ferreira-Halder

Profª Dra Silvy Stuchi Maria-Engler

Dr Adair Vieira Junior

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho ao meu pai, Romildo, com total convicção de que ele tem estado ao meu lado todo o tempo (in memoriam).

A minha mãe, Elenilda e a minha irmã Mariana, a quem dedico tudo que conquistei até aqui e todas as conquistas que certamente estão por vir.

Agradecimentos

Acima de tudo e todos agradeço a Deus por ter me dado sabedoria, força, mostrando caminhos e confortando nas horas difíceis, tornando possível assim a realização deste projeto.

A orientação da Prof^a Dra Carmen, presente em todo o tempo, com apoio sem igual para o desenvolvimento deste projeto, com total dedicação e entusiasmo, não só na realização deste trabalho, mas desde a iniciação científica e em todo processo de seleção para ingresso na pós-graduação, o meu mais sincero agradecimento.

Aos membros da banca de defesa, pela disponibilidade em avaliar o trabalho.

A Dra Karin Julianne Pelizzaro Rocha Brito pela co-orientação e por todo conhecimento compartilhado durante a iniciação científica.

A Prof^a Dra Daniele Ribeiro de Araújo e a todos os membros do seu laboratório na UFABC, que gentilmente me acolheram com muito carinho, em especial a Mônica, pela amizade e carinho durante período de realização do trabalho em Santo André.

Aos colegas do Laboratório de *Bioensaios in vitro e Transdução de Sinal/ OncoBiomarkers Research Lab*, Stefano, Alessandra, Emanuella, Inês, Amanda, Karla que compartilharam o cotidiano do desenvolvimento desse trabalho.

Cláudia Soraggi e Luis Henrique pelo apoio técnico, disposição e disponibilidade em organizar o laboratório de forma a facilitar e colaborar com a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, a secretária do programa de Pós-Graduação, ao Instituto de Biologia, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual e a Universidade Estadual de Campinas, pelo acolhimento desde a graduação.

A minha família, pelo incentivo, encorajamento, compreensão, dedicação, durante toda minha trajetória.

Aos meus tios Geraldo e Dalila, pelo apoio, acolhimento, carinho, cuidado durante o desenvolvimento do trabalho em Santo André.

Ao Gerson e Denise Ciampi, Thaís Tornatore, pelo apoio desde a iniciação científica, e pela amizade, companheirismo, aconselhamentos, torcida, encorajamento, carinho, no decorrer desta trajetória.

Ao Prof Dr Marcelo Bispo e todos os membros do seu laboratório de pesquisa, obrigada pela amizade, incentivo, companheirismo, ajuda em diversos momentos.

A grande amiga Ana Helena, obrigada pelo incondicional apoio, motivação, carinho, e por sempre estar disposta a me ouvir e ajudar.

A Tereza e Givanil, duas grandes amigas que mesmo a distância, nunca deixou de me apoiar, incentivar, obrigada pela amizade, carinho, cuidado, e aconselhamentos nas horas difíceis e de incertezas.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

Este projeto teve como agências de fomentos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – processo nº 2015/01138-1.

Resumo

Resistência a fármacos ainda é um desafio no tratamento do câncer e tem recebido grande atenção na área do tratamento do melanoma. A descoberta de inibidores da *B-RAF*, como o Vemurafenibe, trouxe um grande avanço no tratamento deste tipo de tumor. No entanto, alguns pacientes desenvolvem resistência a este fármaco, após 6 meses de tratamento. Portanto, a descoberta de novas estratégias para o tratamento do melanoma se torna relevante. Neste contexto, partindo da premissa que a riboflavina irradiada apresenta atividade antimelanoma em modelos *in vitro* e *in vivo*, os principais objetivos deste estudo foram desenvolver e caracterizar formulações farmacêuticas para administração tópica da riboflavina (RF), avaliar a responsividade de queratinócitos normais e linhagens de melanoma humano ao tratamento com as formulações e investigar a influência do tratamento com as formulações na biologia de células de melanoma. Foram desenvolvidas quatro formulações a base de Pluronic[®] (F1, F2, F3 e F4) as quais apresentaram alta eficiência de incorporação desta vitamina e diâmetro médio micelar inferior a 32nm, o que as tornam excelentes para uso tópico. A distribuição populacional das micelas bimodal, à 25 °C, passou a uma distribuição unimodal a 32,5°C e com a incorporação da RF. Além disso, a análise calorimetria exploratória indica um aumento no ΔH , apontando que esteja ocorrendo uma interação da RF com a porção correspondente ao core micelar. As formulações apresentaram temperatura de gelificação (Tgel) menor que 25 °C. No contexto de ação biológica, das quatro formulações, as formulações F1 e F2 contendo riboflavina incorporada, seguida de irradiação, apresentam menor efeito citotóxico sobre queratinócitos humanos. No entanto, foram capazes de diminuir a viabilidade das linhagens de melanoma. De forma interessante, observamos que ambas as formulações tenderam a induzir apoptose da linhagem SKMel-103 de forma mais eficiente após 24h de tratamento. Outro ponto que merece destaque foi o fato de que ambas as formulações inibiram o ciclo celular, como indicado pelo aumento da expressão da proteína p21. A formulação F3, *per si*, apresentou efeito tóxico para as linhagens tumorais, em especial para SKMel-29 PLX R (linhagem de melanoma resistente ao fármaco Vemurafenibe). Sob o ponto de vista molecular, o tratamento desta linhagem com a F3 promoveu inibição da autofagia, evidenciado pelo acúmulo da proteína p62, e inibição da quinase AKT. Nossos achados reforçam a ação antimelanoma da RF e indicam a aplicabilidade das formulações F1 e F2 contendo a riboflavina incorporada, no tratamento deste câncer.

Palavras Chave: Melanoma, Riboflavina, Pluronic, Melanoma resistente.

ABSTRACT

Drug resistance is still a challenge in the treatment of cancer and it has received great attention in the area of melanoma treatment. The discovery of *B-RAF* inhibitors, such as Vemurafenib, has brought a breakthrough in the treatment of this type of tumor. However, some patients develop resistance to this drug after 6 months of treatment. Therefore, the discovery of new strategies for the treatment of melanoma becomes relevant. In this context, based on the premise that irradiated riboflavin presents antimelanoma activity in *in vitro* and *in vivo* models, the main objectives of this study were to develop and characterize pharmaceutical formulations for topical administration of riboflavin (RF), to evaluate the responsiveness of normal human keratinocytes and melanoma cell lines to the treatment with the formulations and to investigate the influence of the treatment with the formulations on the melanoma biology. Four formulations based on Pluronic[®] (F1, F2, F3 and F4) were developed, which showed high efficiency of incorporation of RF and micellar diameter average lesser than 32nm, which make them excellent for topical administration. The bimodal distribution of the micelles population, at 25 °C, changed to a unimodal distribution at 32.5 °C, and with the incorporation of RF. In addition, the exploratory calorimetry analysis indicates an increase in ΔH values, indicating that an interaction of the RF is occurring with the micellar core. The formulations had a gel temperature (T_{gel}) lower than 25°C. In the context of the biological action, among the four formulations, the formulations F1 and F2 containing riboflavin incorporated, followed by irradiation, displayed low cytotoxic effect on human keratinocytes. However, they were able to decrease the viability of melanoma cell lines. Interestingly, both formulations tended to induce apoptosis of the SKMel-103 cells more efficiently, after 24 h of treatment. Another important finding was the fact that both formulations inhibited the cell cycle progression, as indicated by the increased expression of the p21 protein. F3 formulation, without riboflavin, presented a toxic effect on the tumor cell lines, especially for SKMel- 29 PLX - R (Vemurafenib resistant melanoma). From a molecular point of view, the treatment of this cell line with F3 promoted inhibition of autophagy, evidenced by the accumulation of p62 protein, and inhibition of AKT kinase. Our findings reinforce the antimelanoma action of RF and indicate the applicability of the F1 and F2 formulations containing incorporated riboflavin in the treatment of this cancer.

Key-words: Melanoma, Riboflavin, Pluronic, Resistant melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Progressão do melanoma.	22
Figura 2: Estrutura Química da Riboflavina (RF).	27
Figura 3: Estrutura da micela composta de Pluronic.	29
Figura 4: Modelo de células de difusão vertical tipo Franz.	38
Figura 5: Curva padrão da Riboflavina.	44
Figura 6: Riboflavina apresenta alta eficiência de interação com os sistemas micelares formados por co-polímeros.	46
Figura 7: Distribuição do diâmetro médio das micelas.	51
Figura 8: Distribuição do diâmetro médio das micelas, após Irradiação.	52
Figura 9: Valores do índice de polidispersão nas temperaturas de 25 e 32,5°C.	53
Figura 10: Valores do índice de polidispersão nas temperaturas de 25 e 32,5°C, após Irradiação.	53
Figura 11: Representação do Reograma para o sistema isolado F1 e F1- RF.	61
Figura 12: Representação do Reograma para o sistema isolado F1 e F1- RF. Fixou-se a Temperatura em 32,5°C e variou-se Frequência 0,1- 1Hz.	61
Figura 13: Representação do Reograma para o sistema isolado F1 e F1- RF, após Irradiação.	62
Figura 14: Representação do Reograma para o sistema isolado F1 e F1- RF, após Irradiação. Fixou-se a Temperatura em 32,5°C e variou-se Frequência 0,1- 1Hz.	62
Figura 15: Perfis de permeação obtidos para diferentes formulações	65

contendo Riboflavina, 250 μ M.

Figura 16: Avaliação do efeito das formulações na viabilidade das linhagens **69-70**

de melanoma e queratinócitos normais.

Figura 17: Avaliação do efeito das formulações na viabilidade das linhagens **71-72**

de melanoma e queratinócitos normais.

Figura 18: Avaliação do efeito das formulações na viabilidade da linhagem **75**

de queratinócitos normais e melanoma, SKMel-103.

Figuras 19: Imagem morfológica da linhagem de queratinócitos humanos **76**

adquirida pelo equipamento Cytation™ 5.

Figuras 20: Imagem morfológica da linhagem de melanoma SKMel-103 **78**

adquirida pelo equipamento Cytation™ 5.

Figura 21: Análise da indução de morte celular. **81**

Figura 22: Formulações F1, F2 isolados e após incorporação de RF, **84**

irradiados com luz UV, modula a expressão de proteínas associadas com a proliferação celular de células SKMel-103.

Figura 23: Formulações F1, F2 isolados e após incorporação de RF, **85**

irradiados com luz UV, modula a expressão de proteínas associadas com morte celular por apoptose de células SKMel-103.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos co-polímeros.	34
Tabela 2: Composição das Formulações Contendo Pluronics.	34
Tabela 3: Diâmetro médio (média \pm d.p., n=3) e porcentagem de distribuição de tamanho micelares, das formulações de Pluronics.	50
Tabela 4: Temperatura e Variação de entalpia ΔH_m (J/g) relativa à micelização dos sistemas contendo Pluronics.	56
Tabela 5: Resultados das análises oscilatória dos copolímeros na ausência e na presença de RF.	60
Tabela 6: Parâmetros de permeação da Riboflavina através de membrana artificial a partir de diferentes formulações de hidrogéis a base de Pluronic.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT – Proteína quinase B

B-RAF – proto-oncogene, serina/treonina quinase

CDE – Calorimetria diferencial exploratória

CDK – Quinase Dependente de Ciclina

CKI – Inibidores de Quinase dependente de Ciclina

c-KIT – Receptor, proto-oncogene, tirosina quinase

CMC – Concentração Micelar Crítica

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

EPR – Retenção de Efeito

ERK – Proteína quinase regulada por sinal extracelular

F1 – Pluronic[®] F127 – PL F127- 25%

F1- RF – PL F127- 25% - Riboflavina

F1- RFI – PL F127- 25% - Riboflavina Irradiada

F2 – Pluronic[®] F127 – PL F127- 30%

F2- RF – PL F127- 30% - Riboflavina

F2- RFI – PL F127- 30% - Riboflavina Irradiada

F3 – Pluronic[®] F127- 25% - Pluronic[®] P123- 5% - PL F127- 25% - PL
P123- 5%

F3- RF – PL F127- 25% - PL P123- 5% - Riboflavina

F3- RFI – PL F127- 25% - PL P123- 5% - Riboflavina Irradiada

F4 – Pluronic[®] F127- 25% - Pluronic[®] F68- 5% - PL F127- 25% - PL F68- 5%

F4- RF – PL F127- 25% - PL F68- 5% - Riboflavina

F4- RFI – PL F127- 25% - PL F68- 5% - Riboflavina Irradiada

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FMN – Flavina mononucleotídeo

HLB – Equilíbrio hidrofílico- lipofílico

LS – Dispersão de Luz

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MET – Receptor tirosina quinase

MMPs – Metaloproteinases

NF1 – Neurofibrina 1

N-RAS – Neuroblastoma RAS

OE – Óxido de Etileno

OP – Óxido de Propileno

PARP- 1 – Poli (ADP- ribose) polimerase- 1

PBS – Tampão fosfato salino

PCS – Espectroscopia de correlação de fótons

PDI – Valores de polidispersão

PEO – Poli (óxido de etileno)

PI – Índice de polidispersão

PI3K – Fosfatidilinositol- 3 quinase

PL – Pluronics

PPO – Poli (óxido de propileno)

PTEN – Proteína tirosina fosfatase homóloga à tensina

Rb – Proteína Retinoblastoma

RF – Riboflavina

RF- PL – Riboflavina- Pluronics

RFI – Riboflavina Irradiada

T_{endset} – Temperatura final de micelização

T_M – Temperatura máxima de micelização

T_{onset} – Temperatura inicial de micelização

UV – Ultravioleta

UVA/ UVB – Raios Ultravioleta tipo A e B

SUMÁRIO

1. Introdução	20
1.1. Melanoma	20
1.2. Tratamentos	23
1.3. Riboflavina	25
1.4. Pluronic	27
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1. Reagentes	32
3.2. Desenvolvimento de Formulações de Uso Tópico Contendo Riboflavina para Tratamento do Melanoma	33
3.2.1. Curva Padrão da Riboflavina	33
3.2.2. Preparação de Hidrogéis a Base de Pluronic e Obtenção do Sistema Riboflavina-Pluronic	33
3.2.3. Avaliação da Interação Riboflavina-Micela	35
3.2.4. Caracterização do Sistema Micelar: Medidas de Diâmetro Hidrodinâmico e Polidispersão	35
3.2.5. Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE) – Caracterização da Reversibilidade Térmica e do Processo de Micelização	36
3.2.6. Determinação dos Parâmetros Reológicos dos Hidrogéis a Base de Pluronic	36
3.2.7. Ensaios de Dissolução e Permeação <i>in vitro</i>	37

3.3.	Cultura de Células	38
3.4.	Análise da viabilidade celular através da redução do MTT	38
3.5.	Análise da expressão de proteínas por <i>Western Blotting</i>	39
3.6.	Avaliação do tipo de morte celular	40
3.7.	Análise estatística dos resultados	41
4.	Resultado e Discussão	42
	Capítulo I – Caracterização físico-química das Formulações	43
4.1.	Curva Padrão da Riboflavina	44
4.2.	Determinação da Interação Riboflavina-micela (Formulação) e do Perfil de Solubilidade da Riboflavina	45
4.3.	Caracterização da Estrutura Micelar das Formulações a Base de Pluronic	47
4.3.1.	Análise da Estrutura Micelar: Medidas de Diâmetro Hidrodinâmico e Valores de Polidispersão	47
4.4.	Caracterização da Estrutura dos Hidrogéis a Base de Pluronic	54
4.4.1.	Caracterização da Reversibilidade Térmica e processo de Micelização por Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE)	54
4.4.2.	Análises Reológicas	57
4.5.	Avaliação do Perfil de Permeação <i>in vitro</i>	63
	Capítulo II – Avaliação da Responsividade de Queratinócitos e Células de Melanoma frente a Riboflavina e Hidrogéis a Base de Pluronic	66
4.6.1.	Avaliação da Influência das Formulações na Viabilidade	67

dos Queratinócitos e Células de Melanoma.	
4.6.2. Avaliação da Viabilidade dos Queratinócitos Humanos	
Normais e Células de Melanoma (SKMel-103) Tratados com Hidrogéis Previamente Irradiados com Luz Ultravioleta.	73
4.7. Avaliação da Capacidade das Formulações Induzirem Morte Celular	
79	
4.8. Responsividade das Células SKMel-103 sob o Aspecto Molecular frente ao Tratamento com Hidrogéis: Reguladores do Ciclo Celular	
82	
Capítulo III - PluronicF127/P123 binary system switches survival pathways off in melanoma cells resistant to BRAF inhibitor	
86	
5. Conclusão	105
6. Referências Bibliográficas	106
7. Anexos I	
Anexos II – Declaração de Direitos Autorais	115
Documento de Bioética e/ou Biossegurança	

1. Introdução

O câncer de pele configura-se como um dos mais frequentes em todas as populações e se apresenta basicamente sob duas formas: o melanoma e o não melanoma. A última estimativa mundial revelou que, em 2012, 232 mil casos novos de melanoma seriam diagnosticados, dentre estes 55 mil viriam a óbito em todo o mundo. As mais altas taxas de incidência de câncer de pele, melanoma e não melanoma foram observadas em países com população caucasiana. Mais de 80% dos diagnósticos de melanomas e 65% dos óbitos por esse câncer foram verificados na Oceania, Europa e América do Norte (Inca, 2016).

No Brasil foram estimados 80.850 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 94.910 nas mulheres em 2016. Esses valores correspondem a um risco estimado de 81,66 casos novos a cada 100 mil homens e 91,98 para cada 100 mil mulheres. Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada; porém sua incidência é baixa (3 mil casos novos em homens e 2.670 casos novos em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (Inca, 2016). Nos Estados Unidos da América a estimativa para o ano de 2017 será de 87.110 novos casos de melanoma diagnosticados, sendo 52.170 homens e 34.940 mulheres. Além disso, estima-se 9.730 mortes por melanoma, entre homens e mulheres (American Cancer Society, 2017; Siegel et al, 2017).

1.1. Melanoma

Melanoma é o mais agressivo tipo de câncer de pele, apesar de ser menos frequente do que os outros tumores. A idade, o sexo e fatores genéticos também são

importantes no desenvolvimento desse tipo de câncer. Cerca de 20% a 30% dos melanomas estão associados à presença de nevo melanocítico prévio (Inca, 2016).

O melanoma se origina a partir de células chamadas melanócitos, responsáveis pela produção do pigmento melanina. Geralmente começa com o surgimento de uma pinta (nevo benigno) e está fortemente ligado à exposição à radiação solar UVA e UVB (raios ultravioleta tipo A e B). Além da pele, o melanoma pode ocorrer em qualquer tecido que contém melanócitos, tal como os olhos e revestimento do aparelho digestório (Holmes, 2014).

A transformação de melanócitos em melanoma é uma das várias etapas do processo que se inicia com a fase de crescimento horizontal ou radial, progredindo então para o fenótipo invasivo (Liu et al, 2014). De fato, o desenvolvimento do melanoma a partir de melanócitos ocorre por meio de um mecanismo gradual que envolve a sucessão clonal e aquisição de alterações genéticas deletérias (Abildgaard, Guldberg, 2015). Após a fase de crescimento vertical, as células do tumor podem invadir profundamente a derme/ hipoderme, e eventualmente penetrar o endotélio de capilares e cair na corrente sanguínea (Figura 1), o que lhes permite formar metástases em órgãos distantes (Liu et al, 2014). A progressão do melanoma metastático depende de uma série complexa de acontecimentos moleculares que incluem mutações que resultam num fenótipo invasivo (Paluncic et al, 2016).

Dois terços dos melanomas apresentam mutações nos genes *B-RAF* (proto-oncogene serina/treonina quinase) e *N-RAS* (neuroblastoma- Ras), o que resulta na hiperativação da via de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (Davies et al, 2002; Albino et al, 1984). Outras alterações genéticas recorrentes incluem amplificação de AKT3 (proteína quinase B) e perda de PTEN (fosfatase homóloga de tensina) pelo

silenciamento epigenético ou deleção (Stahl et al, 2004; Stark e Hayward, 2007). Ambos os eventos levam a sinalização constitutiva de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Em alguns melanomas, a desregulação da via MAPK e PI3K é resultado da superexpressão ou hiperativação dos receptores de fator de crescimento tais como c-KIT (receptor tirosina quinase, proto-oncogene), MET (receptor tirosina quinase) e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Furge et al, 2001; Bardeesy et al, 2005; Curtin et al, 2006) ou mutações que inativam a neurofibrina 1 (NF1), um regulador negativo de Ras (Maertens et al, 2013).

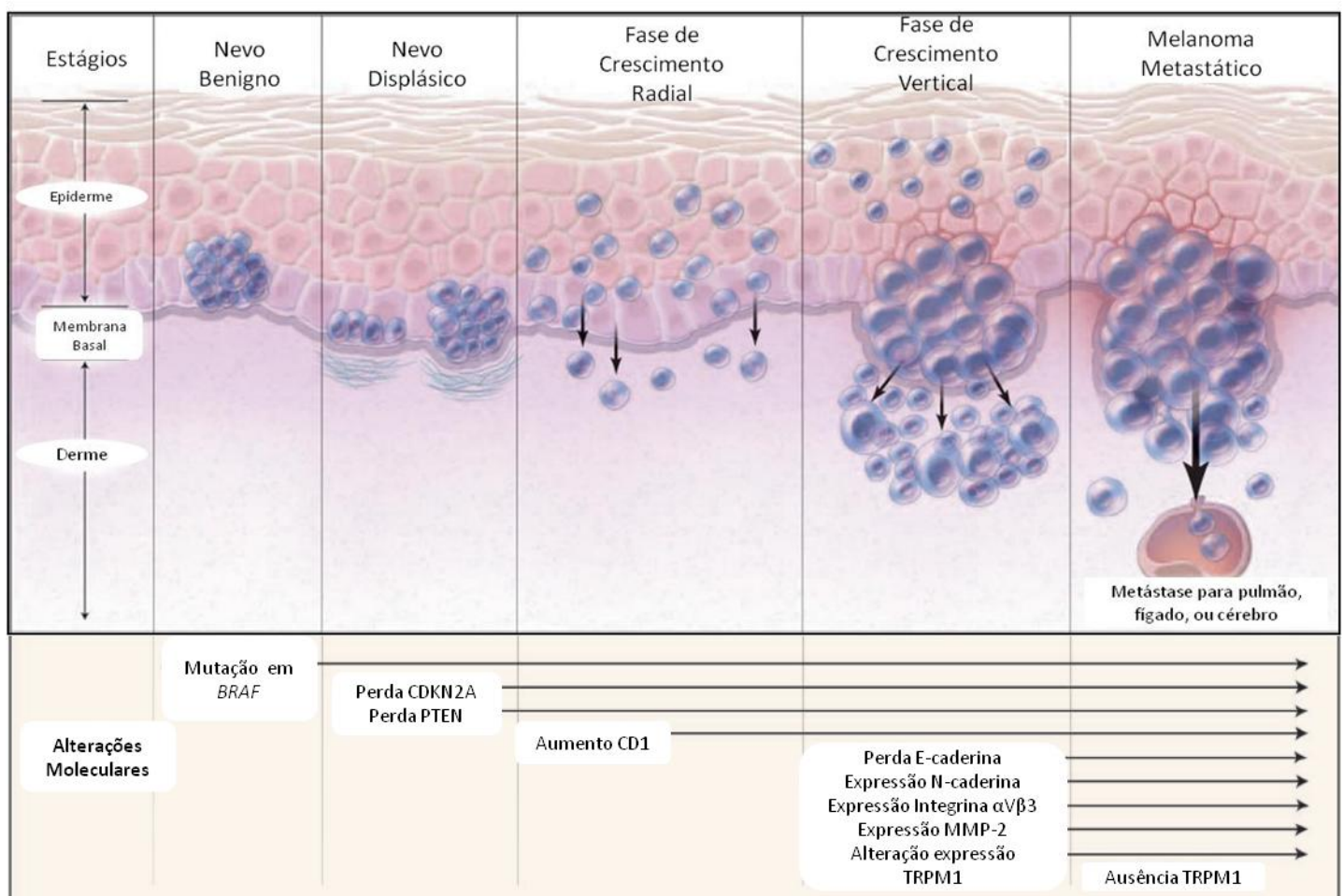


Figura 1: Eventos Biológicos e Alterações Moleculares que culminam na Progressão do Melanoma. A primeira alteração fenotípica nos melanócitos é o desenvolvimento de um nevo benigno. A rápida proliferação de melanócitos transformados leva à formação de um nevo displásico, que é assimétrico e com bordas irregulares. Segue-se uma rápida fase de crescimento radial, que é caracterizada pelo crescimento intraepidermal. A seguir, ocorre uma fase de crescimento vertical, também conhecida como fase de invasão dermal. O melanoma estimula uma rápida

vascularização peritumoral, fornecendo suprimento nutricional para o tumor em desenvolvimento e servindo como rota adicional para a metástase. Sob o aspecto molecular, na fase do nevo benigno ocorre a mutação no gene *BRAF* e consequentemente ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (ERK). Ativação esta relacionada com proliferação e sobrevivência das células. As atipias citológicas observadas no nevo displásico estão relacionadas com mutações adicionais nos genes que codificam quinase dependente de ciclina (*CDK2A*) e na fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) que acarretam perda de função. A progressão do melanoma está associada com diminuição da diferenciação e da expressão de marcadores moleculares regulados pelo fator de transcrição associado à microftalmia (MITF). Nas fases de crescimento vertical e metástase são notáveis disfunções de proteínas envolvidas no controle da adesão celular, tais como: perda da E-caderina, aumento da expressão da N-caderina, integrina $\alpha V\beta 3$ e da metaloproteinase 2 (MMP2) - (Adaptado de Miller & Mihm, 2006).

As principais características clínicas do melanoma são: pinta assimétrica contendo borda irregular, com coloração que pode variar do castanho-claro passando por várias matizes chegando até a cor negra (Piliang, 2011).

Em relação ao diagnóstico, a capacidade invasiva do tumor é determinante fundamental de prognóstico e do tratamento, o qual pode ser descrito de duas formas:

- a) Índice de Breslau, que avalia a profundidade do tumor em milímetros;
- b) Nível de Clark, que descreve a invasão neoplásica em 5 níveis em relação as camadas da pele (Holmes, 2014).

1.2. Tratamentos

O tratamento do melanoma metastático tem a quimiorresistência como problema central, uma vez que se trata de um tumor refratário a praticamente todas as intervenções terapêuticas, com taxas de sobrevida baixas e prognóstico desfavorável dos pacientes. Nos últimos anos avanços na terapia do melanoma foram obtidos principalmente com o desenvolvimento de inibidores das proteínas quinases B-RAF e MEK e de moduladores do sistema imune. Em torno de 40 a 60% dos melanomas

apresentam mutação no gene *B-RAF*, conhecida como V600E ou V600K, que culmina na ativação da via de transdução de sinais de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), resultando em proliferação e sobrevivência celular mesmo na ausência de fatores de crescimento. Desta forma, após a descoberta de mutações no gene *B-RAF* combinada com a identificação de inibidores altamente seletivos para a quinase B-RAF mutada, houve uma revolução no tratamento dos pacientes com melanoma metastático. Em 2011 o primeiro medicamento da classe foi aprovado, o Vemurafenibe. Hoje outros dois medicamentos estão disponíveis, o Dabrafenib e o inibidor do MEK trametinib (Tsai et al, 2008; Bollag et al, 2010).

A razão para esta pronunciada seletividade celular foi demonstrada, em parte, pelo fato das células B-RAF-mutantes serem altamente sensíveis à via de sinalização dependente da ativação da MAPK/ ERK (Solit et al, 2006). O vemurafenibe atua no bloqueio da fosforilação de ERK em células B-RAF mutadas, inibindo a proliferação celular (Bollag et al, 2012). Nos testes clínicos, o vemurafenibe induziu resposta em 50% dos pacientes com melanoma metastático (B-RAF), além de ter apresentado baixo perfil de toxicidade e rápida ação. No entanto, apesar do sucesso do vemurafenibe no tratamento dos pacientes com melanoma metastático, a maioria, se não todos os pacientes, desenvolvem resistência ao mesmo, culminando na progressão da doença num tempo médio de 6 meses (Flaherty et al, 2010; Chapman et al, 2011; Sosman et al, 2012; Emmons et al, 2016; Falletta et al, 2017). A resistência ao vemurafenibe se deve a mecanismos como a reativação da sinalização de ERK1/2 (através de mutação em MEK) ou a ativação de vias de sinalização independentes de ERK1/2 (através do aumento na expressão de receptores tirosina quinase) (Nazarian et al, 2010; Villanueva et al, 2010; Poulikakos et al, 2011; Falletta et al, 2017). Além disto, inibidor de B-RAF mutada também é capaz de induzir reprogramação metabólica nas células tumorais,

como por exemplo, dependência da glutamina que se correlaciona com a resistência ao fármaco (Baenke et al, 2016; Hernandez-Davies et al, 2015; Emmons et al, 2016), aumento na expressão de vários genes que atuam no ciclo do ácido tricarboxílico, assim como dos genes associados com a fosforilação oxidativa e síntese de ATP (Ratnikov et al, 2017).

Diante deste contexto a busca por novos compostos e formulações farmacêuticas com maior eficácia no tratamento, na regressão da doença, na maior taxa de sobrevivência, e principalmente compostos que sejam capazes de atuar em mais de um tipo de melanoma, ou seja, eficazes em pacientes que apresentam melanoma com mutações em sítios variados, se faz extremamente necessária e fundamental para avanços no tratamento.

1.3. Riboflavina

A riboflavina (RF), 7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina (Figura 2), é uma vitamina solúvel em água pertencente ao complexo B. RF apresenta cor amarela, é fluorescente e um potente fotossensibilizador (Powers, 2003). Quando é proveniente da dieta encontra-se sob a forma de coenzimas, flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), ligadas às proteínas. No entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o suco gástrico propicia a liberação destas coenzimas (Merrill et al, 19981; Buzalaf et al, 1998; Edwards et al, 1999).

As vitaminas do complexo B são descritas como fármacos úteis para o tratamento de diversas condições patológicas. Em particular, a RF apresenta potencial atividade citotóxica/antitumoral (Edwards et al, 1999; Souza et al, 2006; de Souza Queiroz et al, 2007; Munõz et al, 2011; Machado et al, 2013; Chaves-Neto et al, 2014), anti-inflamatória (França et al, 2001; Granados-Soto et al, 2004; Toyosawa et al, 2004a;

Toyosawa et al, 2004b; Kodama et al, 2005; Verdrengh, Tarkowski, 2005), e analgésica, por exemplo, doses elevadas são utilizadas no tratamento profilático da enxaqueca (França et al, 2001; Granados-Soto et al, 2004; Schoenen et al, 1998; Sándor et al, 2000; Boehnke et al, 2004). Na clínica a RF de uso tópico já é utilizada, com sucesso, no tratamento da ceratocone e outras doenças que levam ao enrijecimento da córnea, pelo processo natural de envelhecimento ou provocada por *diabetes mellitus* (Raiskup, Spoerl, 2013; Gu, et al, 2014).

Com relação à atividade antitumoral, nosso grupo tem demonstrado que a irradiação com luz UV (Ultravioleta) da RF, em meio de cultura ou em PBS (tampão fosfato salino), leva a obtenção de uma mistura de fotoprodutos contendo majoritariamente riboflavina e lumicromo, além de pequenas quantidades de formilmetilflavina, lumiflavina, 2-cetoriboflavina e 4-cetoriboflavina (de Souza Queiroz et al, 2007; Machado et al, 2013), os quais apresentam excelente atividade antitumoral em células leucêmicas (Souza et al, 2006), câncer de próstata, melanoma e câncer renal (de Souza Queiroz et al, 2007; Machado et al, 2013; Chaves-Neto et al, 2014). De forma bastante interessante, a ação antitumoral da Riboflavina Irradiada (RFI) é mais expressiva quando as células são tratadas com a mistura obtida após a irradiação da riboflavina (riboflavina e fotoprodutos) e não com os fotoprodutos separadamente, e que, a riboflavina não irradiada, não apresenta nenhum efeito antitumoral nos modelos avaliados *in vitro*.

O mecanismo molecular de ação da RFI também tem sido investigado, revelando a modulação de um conjunto de proteínas que culmina na menor agressividade de células tumorais e na indução de morte celular por apoptose (Souza et al, 2006; de Souza Queiroz et al, 2007; Machado et al, 2013; Chaves-Neto et al, 2014). Com relação ao melanoma, Machado e colaboradores (2013) reportaram que a

riboflavina reduziu a metástase de células de melanoma murino para o pulmão, em modelo animal. Estes autores também observaram que a RFI afetou diferentes aspectos metabólicos das células de melanoma murino (B16F10), como inibição da proliferação das células, da capacidade de formação de colônias, da adesão, da migração, e modulação negativa da via hedgehog, MMPs (metaloproteinases) e proteínas quinases (p-mTor, PI3K e p-Src), que parecem ser fundamentais para a diminuição da agressividade das células de melanoma.

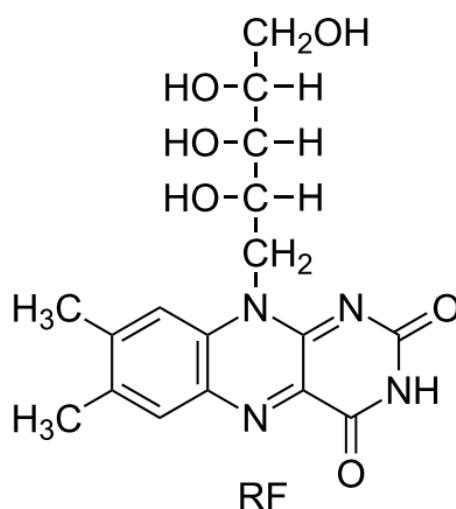


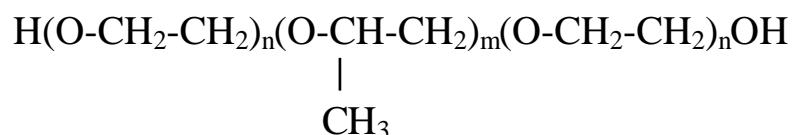
Figura 2: Estrutura Química da Riboflavina (RF). Fórmula Molecular: $C_{17}H_{20}N_4O_6$, Massa Molecular: 376.4 g/mol, λ_{max} : 268nm- 373nm e pK_a = 9.69.

1.4. Pluronics (Polaxamers)

Nanotecnologia à base de polímero tornou-se uma das áreas mais atraentes, e de rápido crescimento, na área farmacêutica. Os nanomateriais que estão sendo pesquisados incluem micelas de polímero, complexos de polímero-DNA, nanogéis, lipossomas, e outros materiais em nanoescala desenvolvidos sob medida para uso médico, os quais são chamados coletivamente de nanomedicamentos. Arranjos específicos de moléculas poliméricas em nanoescala, alcançada dentro de tais materiais, representam oportunidades únicas para o *delivery* eficaz e seguro de fármacos, genes, e

contrastes utilizados no diagnóstico por imagem (Kabanov et al, 1993; Savic et al, 2003; Kwon, 2003; Torchilin et al, 2003; Trentin et al, 2005; Missirlis et al, 2005; Kabanov, Batrakova, 2004; Salem, Searson, 2003; Nayak, 2005; Croy, Kwon, 2006; Escorcia et al, 2007; Hall et al, 2007; Suri et al, 2007).

Um exemplo promissor de tais polímeros é representado por uma classe de copolímeros, Pluronic (“Poloxamers”), com estrutura em bloco. Os copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) apresentam a unidade de repetição:



onde os valores de **n** e **m** podem variar de 4 a 265 e 16 a 69, respectivamente (Alexandridis e Hatton, 1995). Estes copolímeros são comercialmente disponíveis com os nomes de Poloxamers (produzidos pela ICI, Inglaterra) ou Pluronic (produzido pela BASF, Alemanha) - (ICI Catalog, 1992). Os blocos de co-polímeros com diferentes números nas unidades de óxido de etileno (hidrofílico) e óxido de propileno (hidrofóbico) são caracterizados pelo equilíbrio hidrofílico- lipofílico (HLB). Devido ao seu caráter anfifílico estes co-polímeros exibem propriedades surfactantes incluindo a capacidade de interagir com superfícies hidrofóbicas e membranas biológicas. Em soluções aquosas e em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) estes co-polímeros se auto-organizam em micelas. Os diâmetros das micelas de Pluronic geralmente variam em torno de 10 a 100 nm (Kabanov et al, 1995).

O núcleo das micelas consiste em blocos de PPO, hidrofóbicos (core), que são separados do exterior aquoso pelas cadeias hidratadas de PEO, hidrofílicas (coroa). No

core é possível se incorporar vários princípios ativos terapêuticos ou de diagnóstico (Figura 3) - (Kozlov et al, 2000). A coroa PEO garante que as micelas permaneçam em um estado disperso diminuindo as interações medicamentosas indesejáveis com células e proteínas (Batrakova et al, 2004).

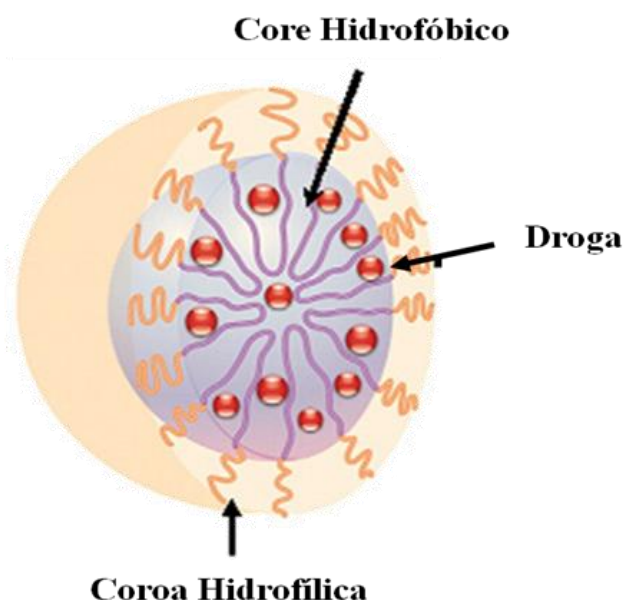


Figura 3: Estrutura da micela composta de Pluronic.

A incorporação de fármacos com baixa massa molecular em micelas de Pluronic pode aumentar a solubilidade e estabilidade dos mesmos, e assim levar a uma melhora na sua farmacocinética e biodistribuição. Existem vários exemplos na literatura de formulações baseadas em Pluronic. Micelas poliméricas foram utilizadas para liberação de fármacos no sistema nervoso central (Kabanov et al, 2003; Spitzenberger et al, 2007), na administração oral de fármacos (Batrakova et al, 1998; Batrakova et al, 1998; Kwon et al, 2007) e no *delivery* de agentes antineoplásicos, tumor específico (Alakhov et al, 1999; Kabanov, Alakhov, 2002; Krupka et al, 2007). Por exemplo, a ação farmacológica do Haloperidol (fármaco antipsicótico) aumentou quando o mesmo foi carregado por micelas de Pluronic P-85 (Kabanov et al, 1989). Estes mesmos autores também reportaram que a incorporação de anticorpos cérebro- específico nas micelas

resultou em um aumento drástico no efeito do fármaco, em modelo animal. Também foi observada uma melhora na biodisponibilidade da genisteína incorporada às micelas de Pluronic F-127, quando administrada por via oral (Kwon et al, 2007). Blocos de copolímeros de Pluronic também melhoraram significativamente a biodisponibilidade de vários fármacos antibacterianos e antifúngicos e aumentaram a atividade destes fármacos no que diz respeito a muitos micro-organismos (Saski, Shah, 1965(I); Saski, Shah, 1965(II); Croy, Kwon, 2004; Croy, Kwon, 2005).

Na administração de quimioterápicos, o encapsulamento de fármacos em micelas pode diminuir o extravasamento do fármaco em tecidos normais e prever um direcionamento passivo do mesmo, para tumores através do reforço de permeabilidade e retenção de efeito (EPR). O EPR ocorre devido à elevada permeabilidade anormal dos vasos sanguíneos que compõe o tumor, combinada com circulação prolongada das micelas. A SP1049C foi a primeira formulação micelar anticâncer, contendo Pluronic L-61 e F-127 e Doxorubicina, a passar por triagem clínica (Valle et al, 2004). Análise de farmacocinética e biodistribuição desta formulação demonstrou maior eficiência no acúmulo do fármaco nos tumores, em comparação com o fármaco livre. Além disso, este estudo demonstrou que picos nos níveis de Doxorubicina formulado (SP1049C), no tumor, foi retardado (Alakhov et al, 1999). Formulação de Doxorubicina, Paclitaxel ou outros medicamentos com Pluronic também resultou em aumento do efeito anticancerígeno destes fármacos em modelos *in vivo* (Alakhov et al, 1999; Alakhov et al, 1996; Venne et al, 1996; Batrakova et al, 1996).

Pelo exposto, o racional do presente estudo se fundamentou em dois aspectos críticos na área de pesquisa sobre melanoma: a) vencer a resistência/agressividade de células de melanoma humano. Portanto, com base nos dados obtidos por nosso grupo, que mostraram o potencial da riboflavina em diminuir o potencial metastático e inibir

outros processos que dão vantagem ao melanoma, a riboflavina irradiada foi escolhida como molécula candidata com potencial farmacológico; e b) desenvolver formulação farmacêutica visando administração tópica. Portanto, tendo em vista a aplicabilidade dos Pluronicos como base para desenvolvimento de nanocarreadores para fins terapêuticos, principalmente para administração tópica, três Pluronicos foram escolhidos como base para a formulação.

2. Objetivos

Este estudo teve como principais objetivos:

- a) Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente formulações farmacêuticas, a base de Pluronicos contendo riboflavina, visando administração tópica;
- b) Avaliar a responsividade de queratinócitos normais e linhagens de melanoma humano ao tratamento com as formulações;
- c) Investigar a influência do tratamento com as formulações na biologia de células de melanoma.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes: Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), sulfato de estreptomicina e penicilina foram obtidos da Nutricell (Campinas, SP, Brasil). Soro Fetal Bovino (SFB) foi obtido da Gibco (Invitrogen, NY, USA). Pluronic[®] F127 (Sigma Chem., cod. P2443), Pluronic[®] P123 (Sigma-Aldrich, cod. 435465-14) e Pluronic[®] F68 (Sigma Chem., cod. P1300), Riboflavina (Sigma, cod. R-4500). Membrana Nitrocelulose, poro 50nm (Spectrapore[®] Spectrum Lab.), foi obtida da Millipore. APC Annexin V (Cat. N° 550474 - BD Biosciences). Meristato de Isopropila P.A. e Álcool Etílico Absoluto foram obtidos da Synth. Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), albumina de soro bovino (BSA), cloreto de sódio (NaCl), Tween 20, desoxicolato de sódio, o-vanadato, fluoreto de sódio (NaF), aprotinina, leupeptina, ditioneitol (DTT), dodecilsulfato de sódio (SDS), tris(hidroximetil) aminometano (Tris), 4-(2-hidroxi-1-piperazina) ácido etanosulfônico (HEPES), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl₂), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), glicina, hidróxido de sódio (NaOH), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de cálcio (CaCl₂), acrilamida e bis-acrilamida foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Azul de bromofenol, Triton X-100, glicerol, metanol e etanol foram obtidos da Merck Sharp & Dohme (Whitehouse Station, NJ, USA). Anticorpos primários: anti-GAPDH (Cat. N° 32233), anti-p62 (SQSTM1) D3 (Cat. N° 28359) foram obtidos da Santa Cruz; anti-LC3 B (MAP1) (Cat. N° 18725-1) foi obtida da Protein Tech. Anti-pAKT (Ser 473) (SAB4300042) foi obtido da Sigma. Anti-PARP -1 (Cleaved p25) (Cat. N° 04-576) foi obtida da Upstate. anti-Beclin (Cat. N° #37385), anti-p-Beclin

(Ser 93/96) (Cat. N° # 124765), anti- p44/42 MAPK (ERK 1/2) (137F5) (Cat. N° # 4645), anti- P-p 44/42 MAPK (Thr 202/ Tyr 204) (20G11) (Cat. N° # 43765), anti- AKT (Cat. N° # 29385), anti- p21 Waf1/Cip1 (12D1) (Cat. N° # 2947), anti- p18 INK4C (DCS118) (Cat. N° # 2896), anti- Ciclina D1 (DCS6) (Cat. N° # 2926), anti- Pan Actin (Cat. N° # 4968), anti- Bax (Cat. N° # 2772), anti- Bcl2 (Cat. N° # 2870S) e os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-camundongo (Cat. N° # 7076P2) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EUA) e o anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti- coelho (Cat. N° NA934V) foi obtido da GE Healthcare.

3.2. Desenvolvimento de formulações de uso tópico contendo Riboflavina para o tratamento do melanoma: Todos os ensaios de preparação e caracterização físico-química dos hidrogéis a base de Pluronic foram realizados no laboratório coordenado pela Prof^a Dra Daniele Ribeiro de Araújo, da Universidade Federal do ABC, localizada em Santo André - SP.

3.2.1. Curva Padrão da Riboflavina (RF): A RF foi dissolvida em PBS na concentração estoque de 250µM. A partir desta solução foram preparadas diluições para a obtenção das seguintes concentrações de RF: 10, 20, 40, 60 e 80µM. Em seguida as absorbâncias medidas a 364nm.

3.2.2. Preparação de hidrogéis a base de Pluronic e obtenção do sistema Riboflavina-Pluronic: Os hidrogéis a base de Pluronic (PL) (Tabela 1) foram preparados em H₂O Milli-Q de acordo com as composições apresentadas na Tabela 2. Para isso, os Pluronic isolados (F1 e F2) ou em combinações binárias (F3 e F4) foram

pesados de acordo com o volume final desejado, em bequer de vidro e mantidos a 4°C, sob agitação, em agitador magnético (100 rpm), por pelo menos 6 horas. Posteriormente, os mesmos foram deixados a 4°C por 24h (Schmolka, 1972). O sistema Riboflavina-Pluronic (RF-PL) foi preparado por dispersão direta do fármaco (0,1mg/mL ou 0,01%) em soluções de PL F127- 25% (F1-RF), PL F127-30% (F2-RF), PL F127-25% - PL P123-5% (F3-RF) e PL F127-25% - PL F68- 5% (F4-RF) mantidos a 4°C, sob agitação (100 rpm) por pelo menos 6 horas (Schmolka, 1972). Após a preparação, as amostras foram armazenadas a 4-8°C até uso posterior. Nos experimentos que requereram irradiação das formulações, as mesmas foram irradiadas com luz UV (253,5 nm, dose de 5 J/cm²) por 30 minutos em cabine de fluxo laminar (The Baker Company, USA). A potência da radiação foi medida através do radiômetro UVX (UVP[®]) acoplado a um leitor UVX-36 (UVP[®]).

Tabela 1: Características dos co-polímeros utilizados para desenvolvimento das formulações.

Co-polímeros	MM	Unidades de OE	Unidades de OP	OE:OP
PL F127	12600	200,45	65,17	3,08
PL P123	5750	39,20	69,40	0,56
PL F68	8400	152,73	28,97	5,27

Tabela 2: Composição das Formulações Contendo Pluronic.

Formulações	Composição		
	F127	P123	F68
F1 (25%)	25%	-	-
F2 (30%)	30%	-	-
F3 (30%)	25%	5%	-
F4 (30%)	25%	-	5%

3.2.3. Avaliação da Interação Riboflavina-micela: Para a análise da interação da RF com as micelas, RF 1mg/mL foi incorporada em cada uma das formulações e, deixada em repouso por 24h protegida da luz, para precipitação do excesso de RF não solubilizado. Posteriormente, a solução foi submetida à centrifugação (13000 rpm/10 min) e foram preparadas diluições a partir do sobrenadante, em água, das formulações de acordo com as concentrações desejadas (2, 4, 8, 12, 16, 20%). Em seguida foi feita a leitura da absorbância da solução no comprimento de onda de 364nm, e determinada a concentração de RF. O resultado foi expresso em função da concentração de RF em água *versus* concentração do Pluronic.

3.2.4. Caracterização do sistema micelar: medidas de diâmetro hidrodinâmico e polidispersão: A técnica utilizada foi de espalhamento de luz para determinação do raio hidrodinâmico e da distribuição de tamanho das micelas poliméricas (polidispersão). Foi utilizado 1 mL de cada uma das formulações a 5% (não irradiadas e irradiadas com luz UV), o qual foi filtrado através de uma membrana de policarbonato (poro de 0,22 µm) e, posteriormente, avaliado em um analisador de partículas NanoSeries ZS90 (Malvern®Instruments). Para tal, as amostras foram colocadas em cubetas com caminho óptico de 1cm, a um ângulo de 173°, nas temperaturas de 25 e 32,5°C, para simular o comportamento das micelas, à temperatura ambiente e a temperatura da pele, respectivamente. Estas amostras foram preparadas com pelo menos 24 horas de antecedência, para favorecer o equilíbrio entre monômeros e micelas (Zhang et al, 2005). Os experimentos foram realizados na Central Experimental Multiusuário da UFABC.

3.2.5. Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE) – caracterização da reversibilidade térmica e do processo de micelização: Para este ensaio, uma gota de cada amostra das 4 formulações de Pluronic: F1 (PL F127- 25%), F2 (PL F127- 30%), F3 (PL F127- 25% - PL P123- 5%) e F4 (PL F127- 25% - PL F68- 5%) (irradiadas e não irradiadas com luz UV) foram pesadas (F1- F2- F3- F4-) (F1-Irrad- /F2-Irrad- /F3-Irrad- /F4-Irrad-) em cadinhos de alumínio e em seguida fechados hermeticamente, então submetidas a três ciclos sucessivos de aquecimento e resfriamento de 0°C a 50°C com razão de aquecimento/resfriamento de 5°C/min, sendo: ciclo 1- aquecimento de 0°C a 50°C; ciclo 2- resfriamento de 50°C a 0°C; e ciclo 3- aquecimento de 0°C a 50°C. Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado com o sistema Riboflavina-Pluronic, para todas as formulações (irradiadas e não irradiadas com luz UV), (F1-RF- / F2-RF- /F3-RF- /F4-RF-) (F1-RFI- / F2-RFI- /F3-RFI- /F4-RFI-). A partir dos termogramas, foi possível obter os seguintes parâmetros termodinâmicos de micelização (Alexandridis, Hatton, 1995; Ma et al, 2007): ΔH = variação de entalpia determinada como a área sob o pico de transição de fase do ciclo de aquecimento; bem como as temperaturas características do processo de formação das micelas, T_{onset} = Temperatura inicial do processo de micelização; T_M = Temperatura onde ocorre o pico máximo de micelização; T_{endset} = Temperatura final de micelização. O Calorímetro Diferencial de Varredura Q-series Q-200, TA Instruments (localizado na Central Experimental Multiusuário da UFABC) e o Calorímetro Exploratório de Varredura DSC 214 – Polyma, Netzsch – Leading Thermal Analysis, foram utilizados para a obtenção das temperaturas relativas à micelização das diferentes preparações de géis.

3.2.6. Determinação dos Parâmetros Reológicos dos Hidrogéis a base de Pluronic:

Tais análises foram realizadas utilizando o reômetro Kinexus Lab+ Malvern, sendo que

primeiramente se fixou uma frequência de 1Hz e variou-se a temperatura de 10° a 50°C e 1 mL de todas as amostras foi analisado, inclusive o sistema Riboflavina-Pluronic, não irradiadas e irradiadas com luz UV. Posteriormente, fixou-se a temperatura em 32,5°C, e variou-se a frequência 0,1 a 10Hz, e todas as amostras foram avaliadas novamente. As medidas oscilatórias permitiram a obtenção de parâmetros relacionados ao módulo elástico (G'), ou módulo de armazenamento, e ao módulo viscoso (G''), ou módulo de perda.

3.2.7. Ensaios de dissolução e permeação *in vitro*: Os ensaios de permeação *in vitro* foram realizados em células de difusão vertical do tipo Franz (sistema automatizado Microette Plus, Hanson Research®) com área de permeação de 1,7 cm² (Figura 4). Em cada ensaio, o compartimento doador da célula foi preenchido com 1mL de cada formulação (não irradiadas e irradiadas com luz UV), enquanto o compartimento receptor foi preenchido com 7mL de tampão PBS (pH 7,4). Como modelo de barreira foi utilizada uma membrana de Nitrocelulose com poro de 50 nm (Millipore®) recoberta com uma camada de 100uL de miristato de isopropila para simular o extrato córneo da pele. As células de difusão vertical do tipo Franz foram mantidas com as formulações durante um período de 24 horas, 32,5°C e sob agitação constante (400 rpm). Em intervalos de tempos pré-estabelecidos (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, e 24h) uma alíquota de 1 mL foi coletada e analisada por espectrofotometria UV-VIS para determinação da concentração de RF. Os dados obtidos foram expressos em quantidades cumulativas de RF, liberada em função do tempo. Os dados foram analisados de acordo com o modelo de Higuchi para a liberação de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica semi-sólida, onde a razão de liberação do fármaco é linear em função da raiz quadrada do tempo, e o fármaco é o único componente que se difunde através do meio:

$$Q_t = K_H t^{1/2}$$

Sendo Q a concentração de fármaco liberado em função do tempo, K é a constante de liberação (coeficiente de difusão) e t é o tempo.

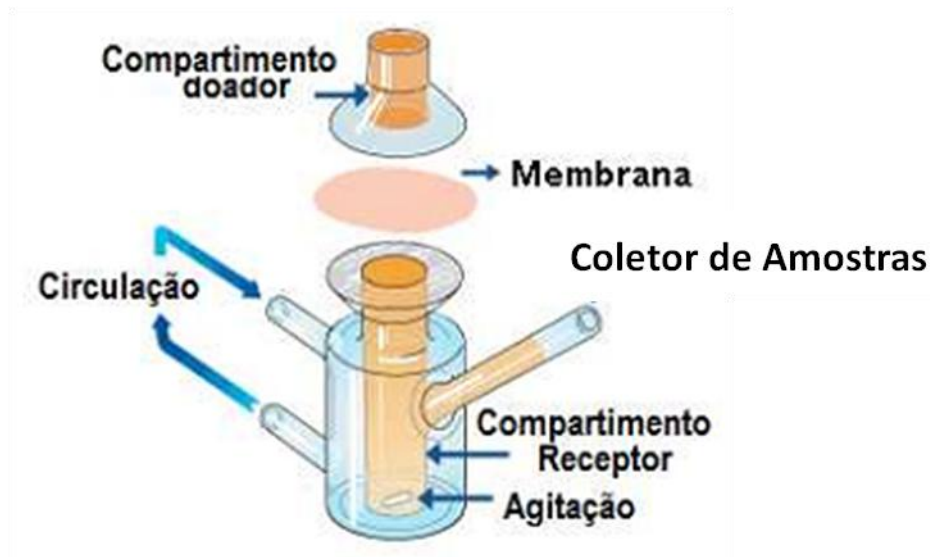


Figura 4: - Modelo de células de difusão vertical tipo Franz (sistema automatizado Microette Plus, Hanson Research®) e sistema manual.

3.3. Cultura de Células: Queratinócitos humanos normais (HaCat) foram gentilmente doados pela Dra. Liudmila Kodach (Amsterdam University) e as linhagens de melanoma humano (SKMel 103, SKMel 28, SKMel 29 e SKMel 29- PLX R) foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler (USP). O cultivo das linhagens celulares foi realizado em frascos para cultivo celular com área de 25 ou 75 cm² com meio DMEM contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em atmosfera umidificada, 5% CO₂ a 37°C e o subcultivo foi realizado periodicamente (2-3 vezes na semana), com Tripsina. As células SKMel 29- PLX R foram mantidas em meio contendo Vemurafenibe 6 µM.

3.4. Análise da viabilidade celular através da redução do MTT: Para a análise de viabilidade de células de melanoma e queratinócitos normais, as mesmas foram

plaqueadas em uma densidade de 7×10^4 células/mL (HACAT, SKMel 103, SKMel 28, SKMel 29) e 14×10^4 células/mL SKMel 29- PLX R em placas de 96 poços (volume de plaqueamento por poço: 100µl), incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 h. Em seguida as células foram tratadas com as formulações nas seguintes concentrações (v/v): 2,5%, 5%, 10% e 15%, por 24h. Para o tratamento das células, com as respectivas diluições das formulações, foi necessário que a placa de 96 poços estivesse sobre um “cooler” durante todo o procedimento. Após o tratamento a placa também foi mantida sobre o “cooler” por aproximadamente 5 min para remoção do meio, em seguida foram adicionados 100µL de meio sem soro contendo MTT (0,5 mg/mL), em cada poço. Após incubação por 3h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foram adicionados 100 µL de álcool etílico absoluto para solubilização do formazan. As placas foram mantidas sob agitação por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) em $\lambda = 570$ nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (Mosmann, 1983). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média de 3 experimentos independentes conduzidos em triplicata.

3.5. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting: As células foram plaqueadas em placas de 100 mm, em uma densidade que variou de acordo com o tipo celular (SKMel 103 $1,3 \times 10^5$ células/mL; SKMel 29- PLX R $2,1 \times 10^5$ células/mL). Após 24 horas de tratamento as células foram coletadas das placas com o auxílio de um raspador de células (“*cell scraper*”), transferidas para tubos do tipo eppendorf, centrifugadas, lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) e lisadas com tampão de lise apropriado contendo inibidores de proteases. As amostras foram sonicadas (2 ciclos/ 10seg) e mantidas em banho de gelo por 2h, com agitações a cada 15 minutos, com o

objetivo de aumentar a eficiência da extração de proteínas. Após centrifugação do extrato celular a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o pellet foi descartado e o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (kit comercial - Sigma) e albumina bovina (BSA) como padrão. Após a dosagem de proteínas, as amostras foram acrescidas de tampão de amostra na proporção 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6.8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0.1 % e glicerol 20%]. A seguir, as amostras foram fervidas por 5 minutos/95°C e aplicadas em gel de poliacrilamida (8 - 12%) contendo SDS (SDS-PAGE).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (previamente ativadas com metanol) por 2h, para proteínas de baixo peso molecular, e 4 h, para proteínas de alto peso molecular, em amperagem constante de 400 mA. As membranas foram bloqueadas com BSA a 5% preparado em tampão Tris contendo tween 20 a 0,05% (TBS-T) e incubadas *overnight* com anticorpos primários diluídos 1:1000 em BSA 1%. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T (3X de 5 min) e incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase-HRP (1:5000) por 2 h. Após lavagem das membranas com TBS-T (3X de 5min), as bandas foram detectadas por quimiluminescência (ECL). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria. Os valores resultantes foram normalizados pelo valor obtido para o controle interno (GAPDH ou Pan-Actin) correspondente a cada banda. As intensidades finais foram expressas relativamente ao controle e como Unidades Arbitrárias (u. a.).

3.6. Avaliação do tipo de morte celular: Riboflavina livre e formulações (F1, F2, F3 e F4) contendo riboflavina foram irradiadas com luz UV (253,5 nm). Em seguida as células SKMel 103 foram tratadas, por 24h, com riboflavina 50µM, com 5% das

formulações contendo riboflavina (F1- RF, F2- RF, F3- RF e F4- RF) ou somente com 5% das formulações sem riboflavina. Em seguida, as células foram ressuspensas a uma densidade de 1×10^5 células em 100 μ l de tampão fosfato salino (PBS). Cem microlitros de tampão de ligação contendo APC Annexin V e 7-AAD (Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit – BD Pharmingen™) foram adicionados às células e incubados no escuro por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram analisadas no citômetro de fluxo (BD FACS Canto II - BD Biosciences).

3.7. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA seguido de Post test Tukey. Foi adotado o nível de significância $P < 0.05$.

- Resultado e Discussão -

Capítulo I

Caracterização físico-química das Formulações

4. Caracterização Físico-química das Formulações

4.1. Curva Padrão da Riboflavina.

A Riboflavina (RF) tem espectro de absorção na região do ultravioleta, com comprimento de onda de absorção máxima em $\lambda=364\text{nm}$. A Figura 5 mostra a curva de absorção da RF em função da concentração, na qual se observa que a faixa de concentração ideal para quantificar a RF é de 10 a 60 μM , para atender a lei de Beer Lambert. Esta caracterização foi importante para se determinar a concentração de RF liberada, a partir das formulações, e para calcular a constante de liberação.

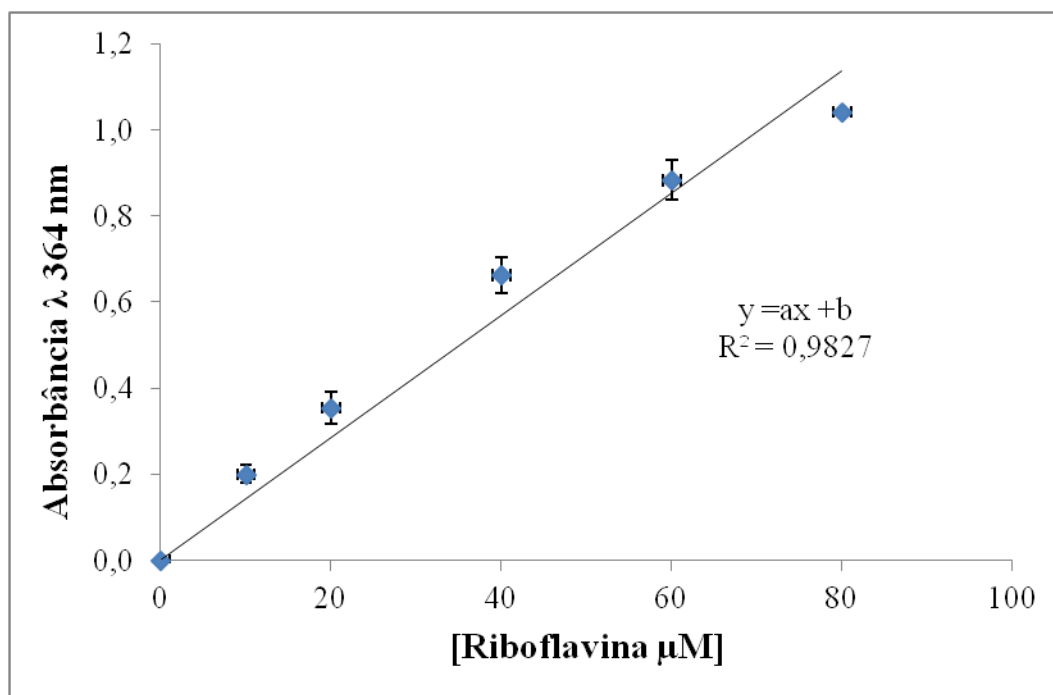


Figura 5: Curva padrão da Riboflavina. Curva de absorbância em função da concentração de Riboflavina em solução, PBS (pH 7,4). Fórmula Molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$, Massa Molecular: 376.4 g/mol, λ_{max} : 268nm- 373nm e $\text{pK}_a= 9.69^3$. Equação da reta de $y = 0,0122x + 0,1167$ $R^2 = 0,9827$ (n=3).

4.2. Determinação da Interação Riboflavina-Micela (Formulação) e do Perfil de Solubilidade da Riboflavina.

Verificou-se como se daria a interação entre a RF com o sistema micelar formado pelos Pluronicos, a partir da concentração micelar crítica (CMC), avaliando a concentração de RF presente em solução aquosa. A principal característica do Pluronic F127, utilizado como base para preparação das formulações estudadas, é que em solução aquosa se mostra termorreversível. Portanto, é bastante utilizado na otimização de formulações farmacêuticas para incorporação de fármacos. O fenômeno da termogelificação é perfeitamente reversível e é caracterizado por uma temperatura de transição sol-gel ($T_{sol-gel}$). Abaixo desta temperatura, a amostra permanece fluida e acima torna-se semi-sólida (Hidrogel) (Dumortier et al, 1991). Com o aumento da temperatura as moléculas do co-polímero PL F127 se agregam formando micelas. Esta micelização é devido à desidratação de unidades de OP, blocos hidrofóbicos, o que representa o primeiro passo no processo de gelificação. Estas micelas são esféricas com um núcleo composto por poli OP desidratado, e uma camada externa hidratada formada por cadeias de poli OE, este arranjo molecular ocorrerá na CMC (Juhász et al, 1989). De acordo com Liu e Chu (2000) sistemas micelares com estrutura cúbica são possíveis de produzir produtos de alta viscosidade, rigidez parcial e lenta dissolução dos géis, tais propriedades facilitam a incorporação tanto de fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos.

Sendo assim, como a RF apresenta características anfifílicas, ou seja, possui uma região predominantemente hidrofóbica, sistema de anéis de isoaloxazina e uma cadeia ribitol (hidrofílica) (Mack, Simon, 2006), verificou-se qual seria o comportamento da RF incorporada às formulações RF-Pluronicos, ao se fazer diluições seriadas destas formulações em H_2O .

De acordo com a Figura 6 nota-se que independente da diluição, a concentração de RF na solução permaneceu em torno de 25 μ M. Este dado mostra que a maior parte da RF se mantém incorporada à micela, uma vez que a concentração total de RF utilizada para o preparo da formulação foi de 250 μ M. Desta forma, cerca de 90% da RF se manteve interagindo com o sistema micelar formado pelos co-polímeros. A capacidade da RF de interagir de forma eficiente com as formulações pode ser explicada pela característica anfifílica desta vitamina. De acordo com este parâmetro podemos dizer que as 4 formulações são eficientes para incorporar a RF.

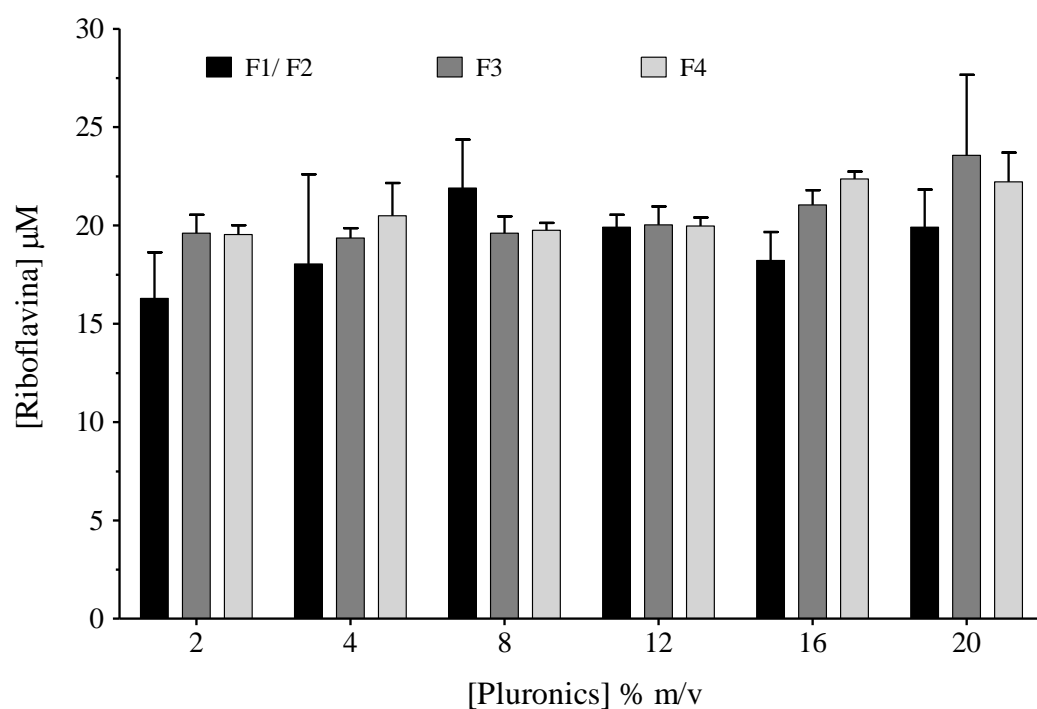


Figura 6: Riboflavina apresenta alta eficiência de interação com os sistemas micelares formados por co-polímeros. Os hidrogéis de Pluronic contendo RF incorporada foram diluídos em água para obtenção das concentrações finais de: 2, 4, 8, 12, 16, 20% (m/v). Em seguida, a absorbância do sobrenadante foi medida a 364 nm (n=3).

4.3. Caracterização da Estrutura Micelar das Formulações a Base de Pluronic:

4.3.1. Análise da Estrutura Micelar: Medidas de Diâmetro Hidrodinâmico e Valores de Polidispersão.

A dispersão de luz (LS), também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons (PCS), é um método rápido para determinar o tamanho médio, distribuição e o índice de polidispersão (PI) de uma amostra. A partir da interação com a luz, o tamanho das nanopartículas é determinado geralmente a uma observação com ângulo de 90°C (Borkovec, 2002).

A Tabela 3 reúne os dados de Diâmetro Médio (em nm) e da Distribuição Média das micelas presentes na formulação F1 e nos sistemas binários F3 e F4 (não irradiados e irradiados com luz UV), assim como as formulações contendo RF (RF-Pluronic), todas em uma concentração final de 5% (diluição em água). As análises foram feitas a 25°C, temperatura ambiente, e a 32,5°C, temperatura da pele. Os dados mostram que conforme se varia a temperatura ocorre uma diminuição no diâmetro médio das micelas formadas por todos os co-polímeros, inclusive nos sistemas binários e após a incorporação da RF. E estas variações ocorrem também na distribuição média das micelas. Observamos ainda, que o processo de irradiação com luz UV também favorece a diminuição do diâmetro médio das micelas. Porém, como se pode observar, em nenhum dos casos o diâmetro médio ficou acima de 100nm, e a incorporação da RF favorece a diminuição deste diâmetro, acompanhada do aumento da temperatura para 32,5°C, onde os valores variam de ~25- 44nm, sendo que após o processo de irradiação estes valores ficam ainda menores, variando de ~22- 43nm. O pequeno tamanho das micelas nas formulações pode facilitar a penetração destes carreadores através do extrato córneo da pele, bem como propiciar que os mesmos atinjam a circulação

sanguínea. Estas características são extremamente desejáveis no caso do tratamento do melanoma metastático.

A distribuição das nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos no organismo depende de algumas de suas características físico-químicas, como seu tamanho. Quanto menor a nanopartículas polimérica maior a facilidade em alcançar seu alvo no organismo. De acordo com a literatura, o tamanho médio dos nanocarreadores micelares formado por co-polímeros de Pluronic F127 pode variar de 10 a 100nm (Batrakova e Kabanov, 2008), valor obtido por diversas técnicas (Cohn et al, 2003).

A determinação do diâmetro e distribuição média das micelas forneceu dados suficientes para estabelecer inferências sobre a influência das variações de concentração e composição dos co-polímeros, temperatura, bem como da adição de RF nas formulações. As medidas no analisador de partículas NanoSeries ZS90, permitiram também avaliar o índice de polidispersão das amostras. Desta forma, é sugerido que com o aumento da temperatura ocorre um deslocamento do equilíbrio entre os monômeros livres, presentes na solução, favorecendo a agregação micelar. Os dados apresentados na Tabela 3 mostram que no geral foram obtidas micelas homogêneas, o que foi favorecido pelo aumento da temperatura, e o processo de irradiação propiciou a formação de micelas ainda mais homogêneas. Além disso, nos sistemas binários, sem e com a incorporação da RF, os parâmetros (diâmetro médio e distribuição média) foram significativamente melhorados atingindo 100% da distribuição média populacional, na temperatura de 32,5°C, característica ideal para formulação de uso tópico.

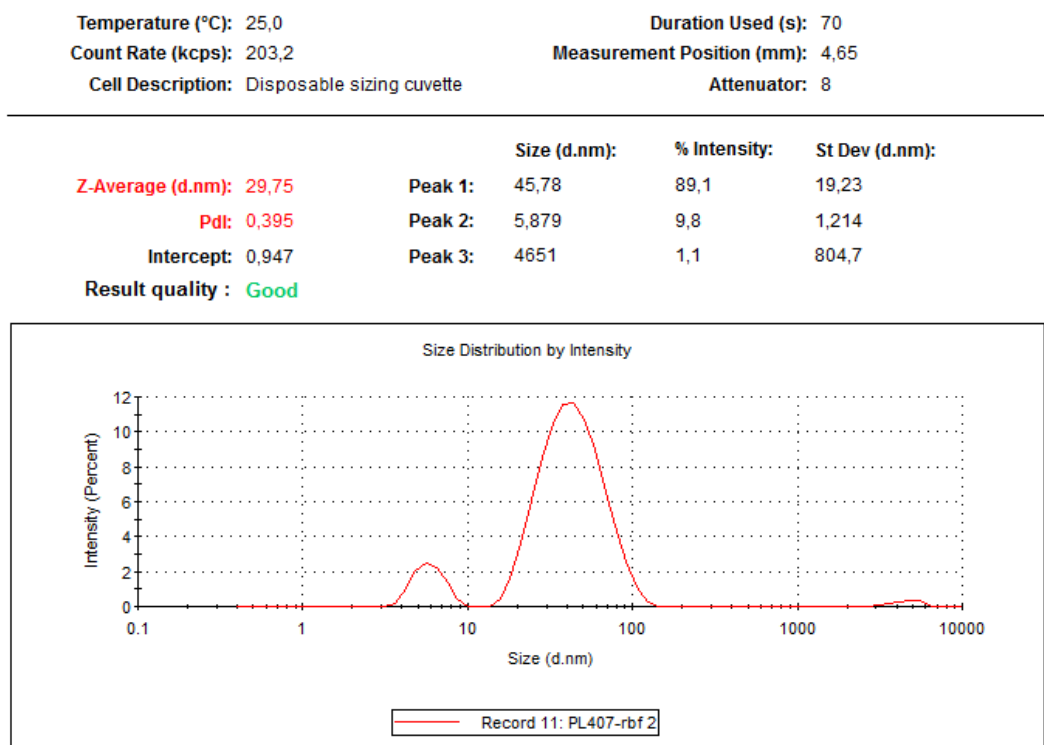
A Figura 7 mostra a distribuição populacional das micelas, e é possível observar a influência da temperatura na redução do diâmetro micelar e na alteração da distribuição populacional. Além disso, nota-se que as amostras que apresentavam uma

distribuição bimodal, a 25°C (Figura 7A) passaram a uma distribuição unimodal a 32,5°C e com a incorporação da RF (Figura 7B). Desta forma, foi possível comprovar a agregação e organização do sistema micelar, bem como a homogeneidade e distribuição de tamanhos das partículas, visto que os valores de índice de PDI (Figura 9) passaram de ~ 0,40 (25°C) para ~ 0,23 (32,5°C), em um dado sistema é desejável que o valor de PDI fique abaixo de 0,3 u.a. Para as formulações F1 e F2 os valores de PDI foram melhores na presença de RF à 32,5°C. Já para F3 e F4 os valores de PDI foram ~0,2 e ~0,3, respectivamente, em todas as condições (Figura 9). A irradiação com luz UV manteve a homogeneidade e distribuição de tamanhos das partículas (Figura 8A e 8B) e os valores de PDI próximos a 0,3 u.a (Figura 10). O mesmo perfil foi observado para as demais formulações (Anexo I).

Tabela 3: Diâmetro médio (média \pm d.p., n=3) e porcentagem de distribuição de tamanho micelar. Foram analisadas amostras não irradiadas ou irradiadas com luz UV das formulações de Pluronic isolados (F1) ou em sistemas binários (F3/ F4), contendo ou não riboflavina, nas temperaturas de 25°C e 32,5°C, e na concentração de 5%.

Formulações	25°C				32,5°C			
	Diâmetro Médio (nm)	Diâmetro Médio (nm) Irradiada	Distribuição Média (%)	Distribuição Média (%) Irradiada	Diâmetro Médio (nm)	Diâmetro Médio (nm) Irradiada	Distribuição Média (%)	Distribuição Média (%) Irradiada
F1/F2 (PL F127)	43,2 \pm 1,2	43,1 \pm 4,6	91,4	83,7	31,7 \pm 1,6	22,6 \pm 1,9	83,4	99,5
	5,3 \pm 0,5	5,0 \pm 0,2	8,6	16,3	1,7 \pm 0,6	1,2 \pm 2,1	13,7	0,5
F1/F2- RF (PL F127- RF)	43,7 \pm 2,2	41,9 \pm 9,1	89,0	90,0	25,2 \pm 1,8	22,0 \pm 2,6	97,8	97,4
	5,7 \pm 0,2	5,2 \pm 0,5	9,0	10,0	4,0 \pm 0	3,3 \pm 3,0	2,2	2,6
F3 (PL F127 – PL P123) (5:1)	35,9 \pm 0,6	40,3 \pm 6,3	100	100	26,4 \pm 1,6	24,8 \pm 2,2	100	100
	0	0	0	0	0	0	0	0
F3- RF (PL F127 – PL P123 (5:1) – RF)	37,6 \pm 1,3	35,7 \pm 5,6	98,2	100	26,2 \pm 1,4	24,0 \pm 2,0	100	100
	1,9 \pm 3,4	0	1,8	0	0	0	0	0
F4 (PL F127 – PL F68) (5:1)	43,8 \pm 1,7	41,4 \pm 6,8	90,7	88,5	28,5 \pm 1,1	24,3 \pm 0,6	100	100
	5,2 \pm 0,4	4,9 \pm 0,3	9,3	11,5	0	0	0	0
F4- RF (PL F127 – PL F68 (5:1) – RF)	41,8 \pm 1,5	36,5 \pm 8,7	90,6	89,6	27,3 \pm 1,1	23,7 \pm 0,2	100	100
	5,2 \pm 0,3	4,5 \pm 0,8	9,4	10,4	0	0	0	0

A



B

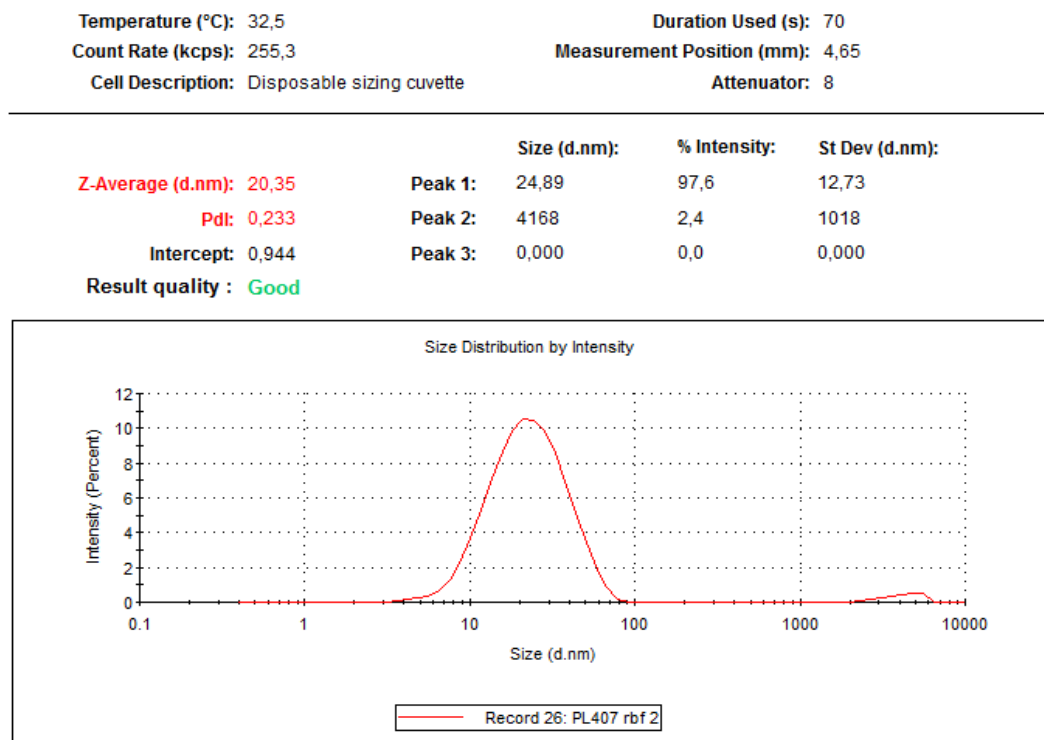
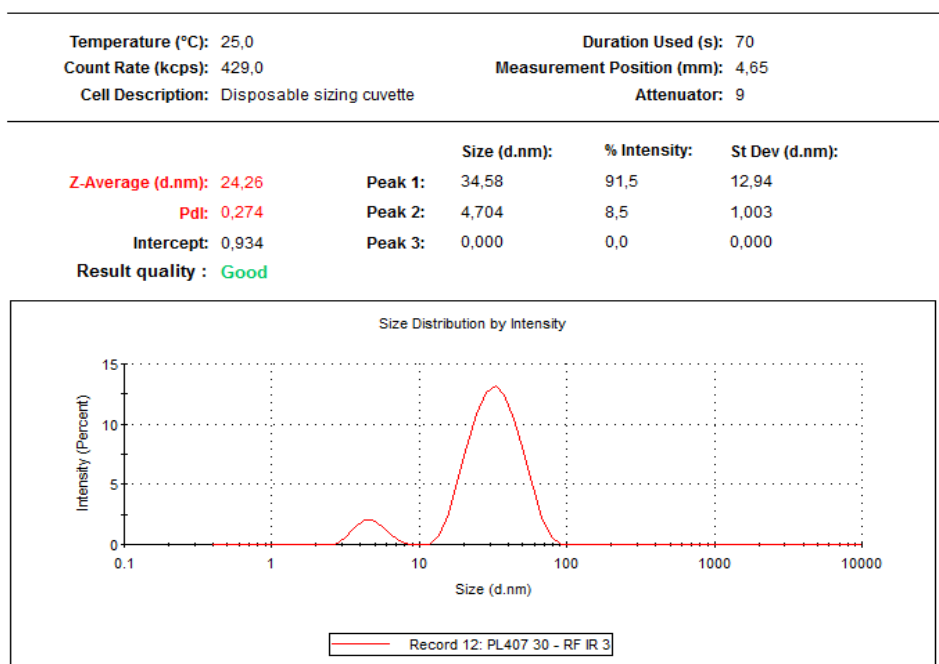


Figura 7: Distribuição do diâmetro médio das micelas para o sistema RF- F1/ F2.
 (A) Experimento realizado a 25°C e (B) 32,5°C. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

A



B

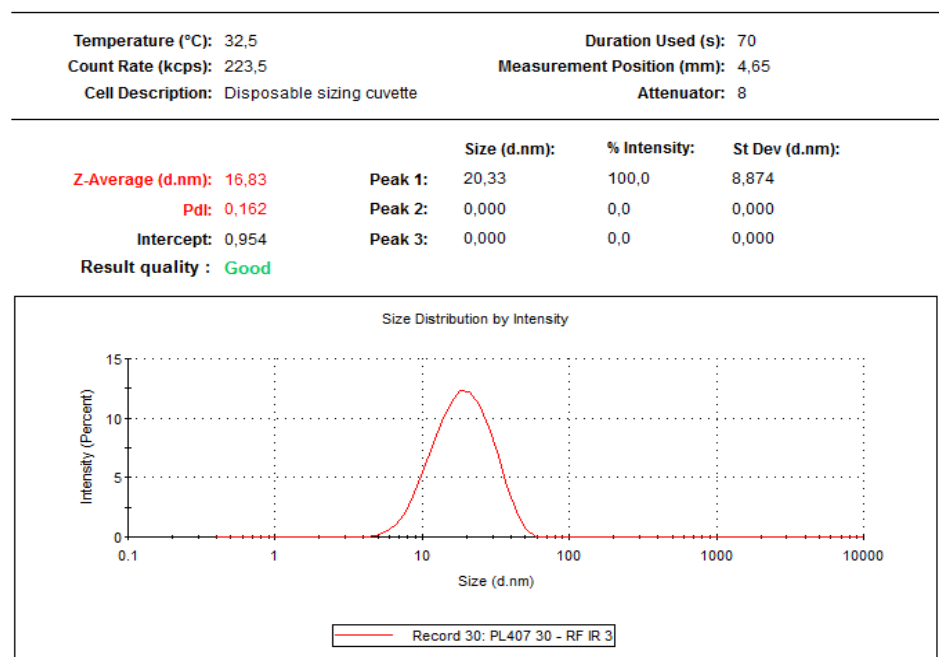


Figura 8: Distribuição do diâmetro médio das micelas para o sistema RF- F1/ F2. (C) Experimento realizado a 25°C e (D) 32,5°C, após Irradiação por 30 minutos com luz UV. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

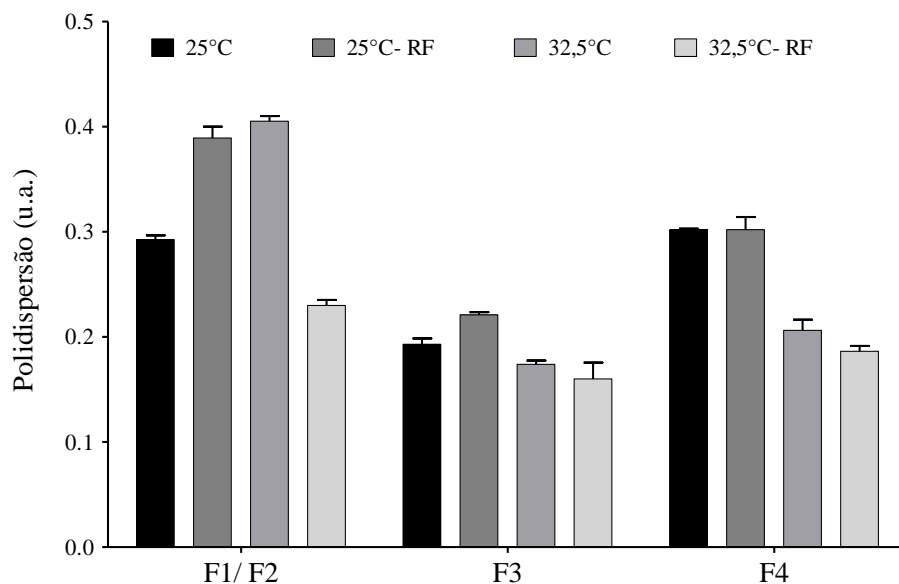


Figura 9: Valores do índice de polidispersão nas temperaturas de 25° e 32,5°C. Formulações de Pluronic isolados (F1/ F2) ou em sistemas binários com (F3/ F4), na concentração de 5% e na presença e ausência de Riboflavina. (n=3).

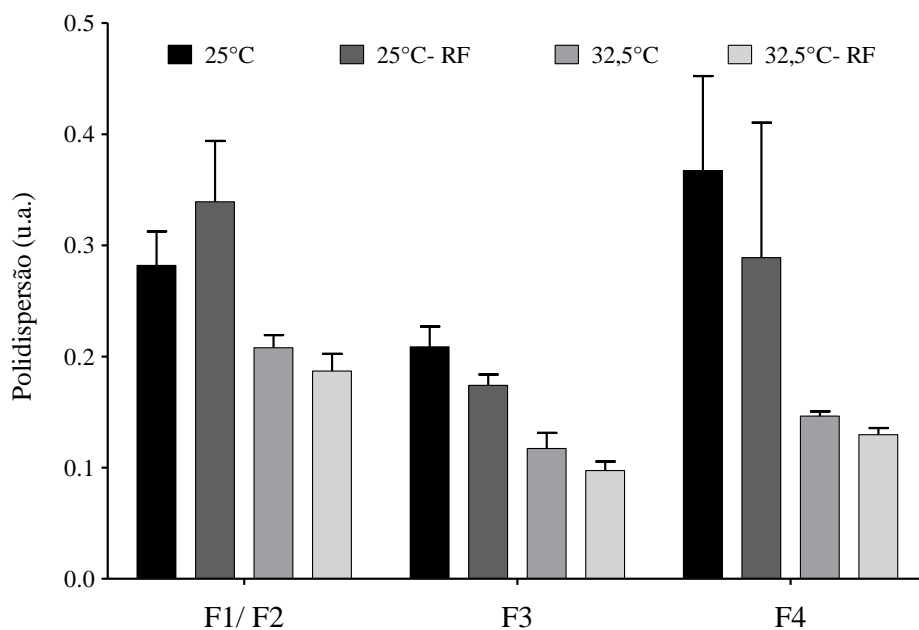


Figura 10: Valores do índice de polidispersão nas temperaturas de 25° e 32,5°C. Formulações de Pluronic isolados (F1/ F2) ou em sistemas binários com (F3/ F4), na concentração de 5% e na presença e ausência de Riboflavina, após Irradiação por 30 minutos com luz UV. (n=3).

4.4. Caracterização da Estrutura dos Hidrogéis a Base de Pluronic:

4.4.1. Caracterização da Reversibilidade Térmica e processo de Micelização por Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE).

A termodinâmica da formação micelar é bem estabelecida. Em geral, o processo de micelização obedece a uma relação entre o equilíbrio molecular dos co-polímeros (em forma de monômeros dispersos) e os agregados multimoleculares, as micelas (Zhang et al., 2005).

A técnica calorimétrica diferencial exploratória (CDE) permite avaliar o processo de micelização, o qual ocorre em temperaturas inferiores às necessárias à transição sol-gel (Yang et al., 2005). Desta forma, a CDE permite a análise tanto da temperatura quanto da variação de entalpia relativa à micelização, sendo possível determinar a T_{onset} (Temperatura inicial ao processo de micelização), T_M (Temperatura onde ocorre o pico máximo de micelização), T_{endset} (Temperatura final de micelização) e por fim, a variação de entalpia ΔH , energia necessária fornecida ao sistema para que ocorra a formação de micelas. Os valores de T_{onset} e T_{endset} indicam a temperatura que ocorre a associação das unidades de OE com as unidades de OP, dando início ao processo de micelização (Artzner et al, 2007).

Os resultados de CDE são apresentados em formas de termogramas que representam a diferença de energia (em forma de calor) necessária para um determinado sistema (hidrogéis) desencadear o processo de micelização. As análises foram realizadas para os co-polímeros isolados e em sistemas binários (na presença e ausência de RF), sendo que, as amostras foram submetidas a três ciclos de resfriamento- aquecimento (razão de 5° C/min., de 0 a 50°C).

Nos termogramas obtidos para os polímeros isolados e em sistemas binários, com e sem a incorporação de RF, é possível observar que a presença de RF não altera a formação de micelas, porém, a energia necessária fornecida ao sistema quando a RF está presente é maior, ou seja, ocorre um aumento no ΔH . Este dado indica que está ocorrendo uma interação da RF com a porção correspondente ao core micelar. Como mostrado na Tabela 4, é possível notar que a incorporação de RF nos hidrogéis acarretou na variação do ΔH , em todas as formulações, padrão que se manteve após a irradiação. As análises térmicas para os hidrogéis contendo apenas a formulação F1 mostraram picos endotérmicos (Anexo II) com um pequeno deslocamento, o que não é observado para a formulação F2. Este fato está diretamente relacionado com o aumento da concentração do co-polímero. Por outro lado, as análises referentes à formulação F4 (co-polímero hidrofóbico) contendo RF 250 μ M mostraram uma temperatura de micelização (T_M) de 15°C e uma variação de entalpia (ΔH) de 10,28 J/g. De forma bastante interessante, quando este sistema binário foi irradiado com luz UV a T_M foi de 12,2 °C e o ΔH de 3,5 J/g.

Tabela 4: Temperatura e Variação de entalpia ΔH (J/g) relativa à micelização dos sistemas contendo Pluronic isolado (F1/ F2) ou em sistema binário (F3/ F4) na presença ou ausência de Riboflavina, irradiados e não-irradiados com luz UV.

Formulações	T onset (°C)	T onset (°C)	T _M (°C)	T _M (°C)	T endset (°C)	T endset (°C)	ΔH (J/g)	ΔH (J/g)
	Irradiada		Irradiada		Irradiada		Irradiada	
F1 (PL F127- 25%)	11,6	10,75	15,6	14,34	24,5	22,42	3,62	4,168
F1- RF (PL F127- 25% - RF)	11,8	10,76	16,3	14,40	24,2	23,03	3,60	3,413
F2 (PL F127- 30%)	10,5	6,34	15,0	10,60	21,3	21,80	2,73	4,529
F2- RF (PL F127- 30% - RF)	9,2	3,89	14,3	7,70	22,3	20,24	4,17	6,764
F3 (PL F127- 25% - PL P123- 5%)	6,4	6,92	12,9	11,48	20,2	21,85	5,04	6,534
F3- RF (PL F127- 25% - PL P123- 5% - RF)	6,5	6,34	12,9	11,14	21,5	19,10	6,05	7,258
F4 (PL F127- 25% - PL F68- 5%)	9,0	8,44	14,0	12,17	18,9	20,85	2,40	3,858
F4- RF (PL F127- 25% - PL F68- 5% - RF)	9,6	8,58	15,0	12,21	23,2	19,91	10,28	3,507

4.4.2. Análises Reológicas.

O comportamento reológico representa um papel fundamental nas formulações à base de Pluronic F127, esta análise permite a determinação da faixa de temperatura e consequentemente detecta, com grande sensibilidade, interações entre os sistemas de copolímeros e Pluronic F127. Em particular, este método oferece informações chave sobre a cinética de termogelificação (Miller, Drabik, 1984; Lenaerts et al, 1987).

Análise de reologia permite a determinação da temperatura de transição sol-gel, aplicada ao sistema, a qual está relacionada com mudanças significativas nas propriedades reológicas das amostras. Em baixas temperaturas, as formulações de Pluronic comportam-se como fluídos Newtonianos, enquanto que acima da temperatura de gelificação, comportam-se como pseudoplástico (Artzner et al, 2007).

Com o objetivo de avaliar o comportamento reológico das formulações, experimentos foram realizados para determinação dos módulos elástico G' (armazenamento) e viscoso G'' (perda), em função da variação de temperatura e frequência. Relatos da literatura demonstram que quando ocorre o predomínio do módulo G' sobre G'' o sistema possivelmente, apresenta uma maior interação entre as cadeias poliméricas, isto é observado para polímeros e/ou surfactantes formadores de rede (como os polímeros de ácido acrílico e o brometo de cetiltrimetilamônio- CTAB, respectivamente (Yariv, et al., 2010). Para os sistemas aqui preparados, um raciocínio semelhante pode ser aplicado considerando que os maiores valores de G' em relação ao G'' seriam favorecidos por um aumento das interações entre os agregados micelares, sendo dependentes dos tipos de forças de interação e das distâncias intermicelares.

Os resultados obtidos revelam que a 32,5°C, temperatura preconizada para o desenvolvimento dos sistemas de hidrogéis para uso tópico, as formulações se

apresentam com estrutura de hidrogel, uma vez que os valores para o módulo elástico foram maiores que os observados para o módulo viscoso, em todas as formulações, inclusive após a irradiação com luz UV (Tabela 5). Estas análises revelam que um maior valor de G' em relação a G'' é favorecido nos hidrogéis e a incorporação de RF e irradiação não alteram esta relação, ou seja, G' é sempre maior quando comparado a G'' , portanto o módulo elástico predomina sobre o modo viscoso.

A Figura 11 representa os reogramas com as variações dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da Temperatura para os sistemas isolados constituídos de PL F127 e PL F127- RF e a Figura 13, os reogramas após irradiação com luz UV. Com as análises destes reogramas, onde se variou a temperatura, T_{inicial} 10° e T_{final} 50°C, e mantendo a frequência em um valor fixo de 1Hz, foi possível determinar a Temperatura de gelificação (T_{gel}) para cada um dos sistemas, onde os valores exatos estão mostrados na Tabela 4. A determinação da T_{gel} é de extrema importância para o sistema em desenvolvimento, uma vez que se pretende administrar os mesmos de forma tópica. Neste caso, com exceção da formulação F4, todas as outras apresentaram T_{gel} abaixo de 25°C, temperatura ambiente. Além disso, a incorporação de RF não alterou este parâmetro. Portanto, estas formulações encontram-se na forma de hidrogel, sendo adequadas para uso tópico. Apesar da F4, apresentar T_{gel} de ~30°C com e sem a incorporação de RF, isto não configura que esta formulação não seja indicada para uso tópico, pois em contato com a pele na temperatura de 32,5°C, ocorrerá a formação do hidrogel. Os outros reogramas podem ser observados no Anexo III.

De forma intrigante, o processo de irradiação provocou uma alteração na T_{gel} para o sistema isolado composto por F2 com RF incorporada, onde a T_{gel} passou de 19,82°C para 14,63°C, após irradiação por 30 min., o que torna a formulação ainda mais interessante para uso tópico, considerando a temperatura da pele de 32,5°C.

Os géis a base de PL F127 em associação com PL P123 e PL F68, mesmo após sofrerem irradiação por luz UV, apresentam-se como materiais viscoelásticos, uma vez que foram determinados os valores para o módulo elástico (característica dos materiais sólidos), e para o módulo viscoso, característica dos materiais líquidos (Freitas, et al., 2009). No entanto, vale ressaltar que tal comportamento é dependente da temperatura, sendo possível inferir que à temperatura de análise (32,5°C) os valores de G' apresentaram-se constantes, como pode ser observado no reograma (Figura 12) onde se fixou a temperatura em 32,5°C e a frequência sofreu uma variação de 0,1- 10Hz. Os valores determinados para G' foram maiores que os observados para G'' , padrão também observado após irradiação (Figura 14). Este comportamento é característico de gel verdadeiro (Nicoleti e Telis, 2009).

Tabela 5: Resultados das análises oscilatória dos copolímeros na ausência e na presença de RF. Reogramas com valores de G' e G'' em mPa e frequência de 1Hz, medidas realizadas na temperatura de 32,5°C na forma semissólida pseudoplástica (gel).

Formulações	G' (Pa)	G' (Pa) Irradiada	G''(Pa)	G''(Pa) Irradiada	G'/G''	G'/G'' Irradiada	η^{\pm} (mPa s)	η^{\pm} (mPa s) Irradiada	$\eta^{\pm 25^{\circ}\text{C}}$ (mPa s)	$\eta^{\pm 25^{\circ}\text{C}}$ (mPa s) Irradiada	Tgel (°C)	Tgel (°C) Irradiada
F1 (PL F127- 25%)	1,34.10 ⁴	1,48.10 ⁴	3,50.10 ²	3,55.10 ²	3,82.10 ¹	4,17.10 ¹	2,13.10 ⁶	2,35.10 ⁶	1,62. 10 ⁶	1,83. 10 ⁶	22,40	21,87
F1- RF (PL F127- 25% - RF)	1,44.10 ⁴	1,37.10 ⁴	3,24. 10 ²	3,27. 10 ²	4,45. 10 ¹	4,19. 10 ¹	2,30. 10 ⁶	2,19. 10 ⁶	1,73. 10 ⁶	1,68. 10 ⁶	22,50	22,19
F2 (PL F127- 30%)	2,21. 10 ⁴	2,54. 10 ⁴	3,80. 10 ²	5,44. 10 ²	5,82. 10 ¹	4,67. 10 ¹	3,52. 10 ⁶	4,04. 10 ⁶	2,90. 10 ⁶	3,45. 10 ⁶	19,49	17,29
F2- RF (PL F127- 30% - RF)	1,88. 10 ⁴	3,19. 10 ⁴	3,11. 10 ²	7,49. 10 ²	6,06. 10 ¹	4,26. 10 ¹	3,00. 10 ⁶	5,07. 10 ⁶	2,44. 10 ⁶	4,46. 10 ⁶	19,82	14,63
F3 (PL F127- 25% - PLP123- 5%)	2,32. 10 ⁴	1,95. 10 ⁴	3,18. 10 ²	3,96. 10 ²	7,30. 10 ¹	4,93. 10 ¹	3,70. 10 ⁶	3,10. 10 ⁶	3,11. 10 ⁶	2,65. 10 ⁶	18,97	19,68
F3- RF (PL F127- 25% - PL P123- 5% - RF)	1,90. 10 ⁴	1,93. 10 ⁴	3,63. 10 ²	3,23. 10 ²	5,23. 10 ¹	5,97. 10 ¹	3,02. 10 ⁶	3,08. 10 ⁶	2,56. 10 ⁶	2,58. 10 ⁶	19,45	19,86
F4 (PL F127- 25% - PL F68- 5%)	9,55.10 ³	8,81.10 ³	6,58. 10 ²	5,41. 10 ²	1,45. 10 ¹	1,63. 10 ¹	1,52. 10 ⁶	1,40. 10 ⁶	2,13.10 ²	2,14.10 ²	29,60	30,4
F4- RF (PL F127- 25% - PL F68- 5% -RF)	8,88.10 ³	7,84.10 ³	6,06. 10 ²	6,13. 10 ²	1,47. 10 ¹	1,28. 10 ¹	1,42. 10 ⁶	1,25. 10 ⁶	1,98. 10 ²	1,91. 10 ²	30,17	31,1

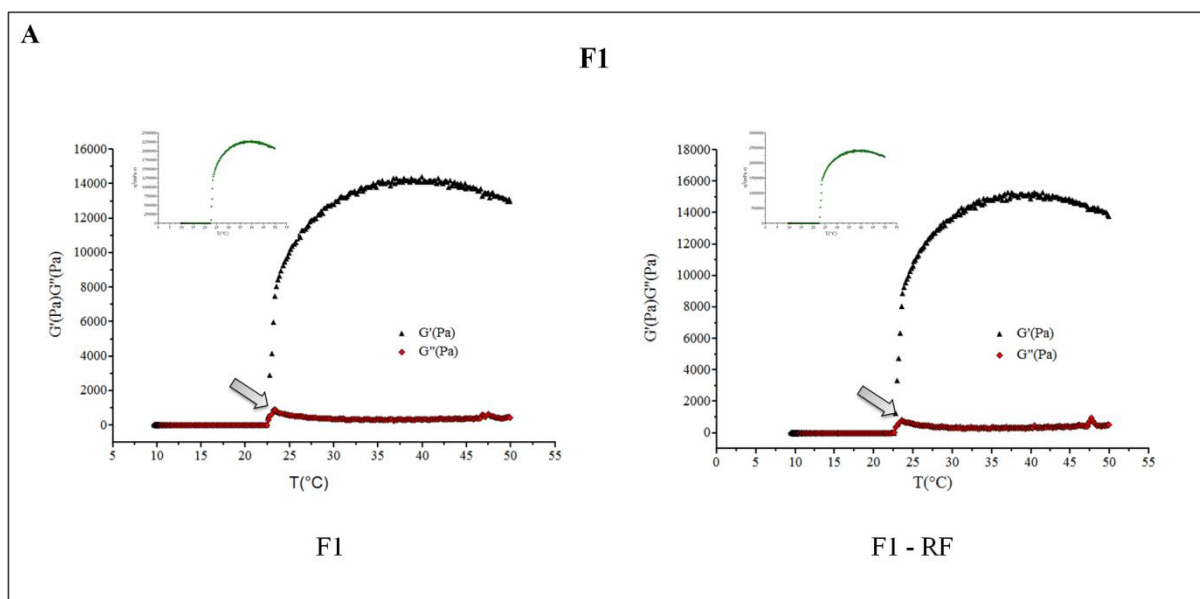


Figura 11: Representação do Reograma para o sistema isolado F1 com e sem a incorporação de RF. Fixou-se a frequência em 1Hz e variou-se a temperatura $T_{\text{inicial}} 10^{\circ}$ e $T_{\text{final}} 50^{\circ}\text{C}$ ($n=3$). Seta indica a Tgel.

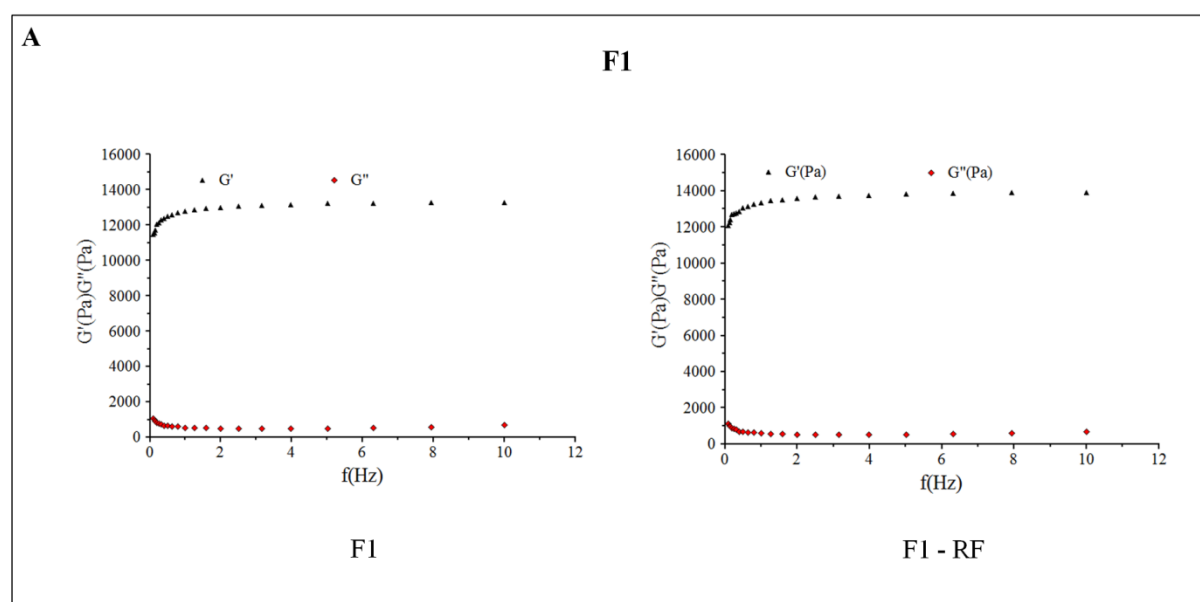


Figura 12: Representação do Reograma para o sistema isolado F1 com e sem a incorporação de RF. Fixou-se a Temperatura em $32,5^{\circ}\text{C}$ e variou-se Frequência 0,1-1Hz ($n=3$).

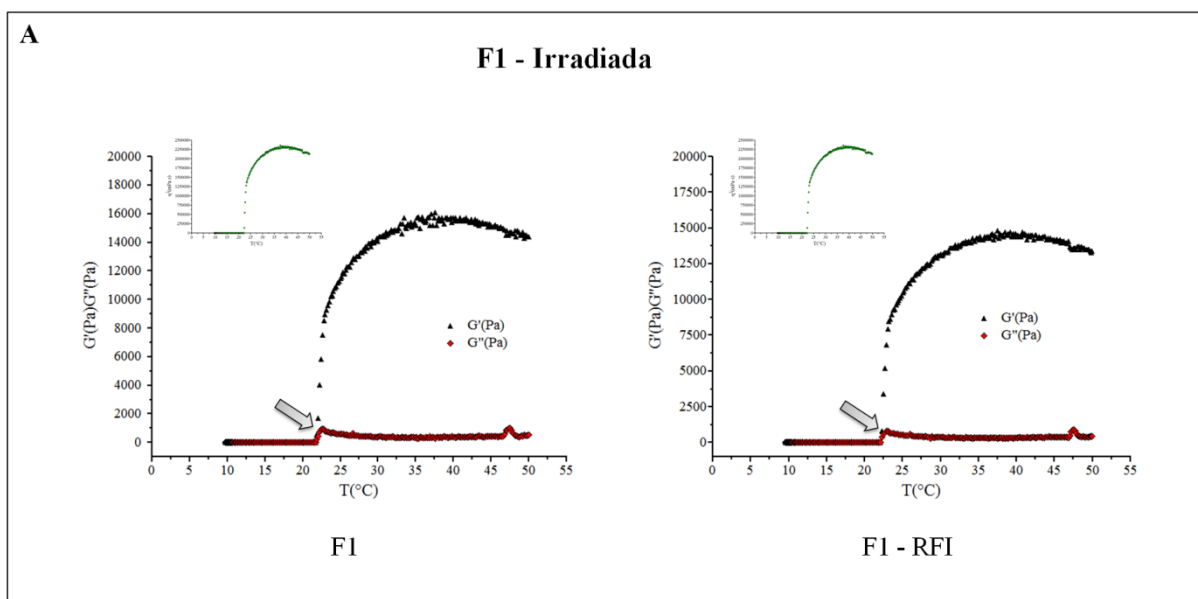


Figura 13: Representação do Reograma para o sistema isolado de F1 com e sem a incorporação de RF, após Irradiação por 30 minutos com luz UV. Fixou-se a frequência em 1Hz e variou-se a temperatura T_{inicial} 10° e T_{final} 50°C ($n=3$). Seta indica a Tgel.

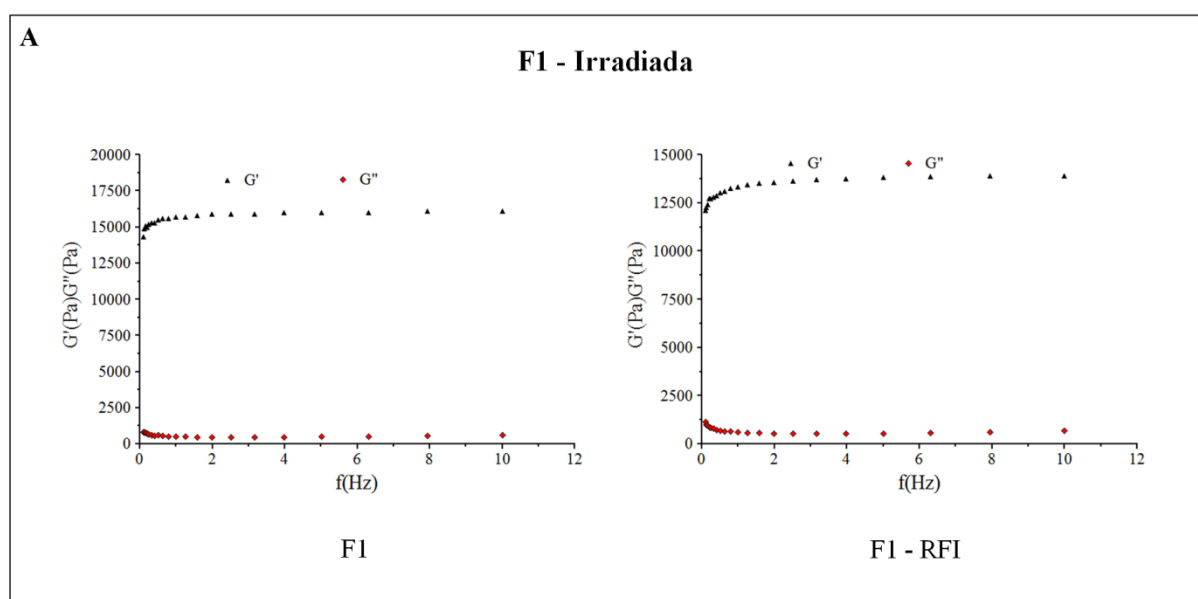


Figura 14: Representação do Reograma para o sistema isolado F1 com e sem a incorporação de RF, após Irradiação por 30 minutos com luz UV. Fixou-se a Temperatura em 32,5°C e variou-se Frequência 0,1- 1Hz ($n=3$).

4.5. Avaliação do Perfil de Permeação *in vitro*.

Para os experimentos de permeação *in vitro*, o modelo de barreira utilizado foi constituído de uma membrana de nitrocelulose com poro de exclusão molecular de 0,05µm, tamanho semelhante aos poros encontrados na pele humana. A referida membrana foi recoberta com uma camada de miristato de isopropila, com a finalidade de simular as propriedades hidrofóbicas do estrato córneo da pele humana. A partir dos perfis de permeação da RF mostrados na Figura 15, os dados foram analisados de acordo com a equação de Higuchi. Este modelo descreve a liberação de um fármaco, a partir de uma forma farmacêutica semissólida, sendo que a taxa de liberação do fármaco é linear em função da raiz quadrada do tempo, quando o fármaco é o único componente que se difunde através do meio (Equação 1). Nesta equação o mecanismo de liberação dos fármacos é descrito como um processo de difusão seguindo a lei de Fick (Lopes et al., 2005).

$$Q_t = K_H t^{1/2}$$

Equação 1: Modelo de Higuchi para liberação de fármaco a partir de formas farmacêuticas semissólidas. K_H =coeficiente de liberação. Q_t =Quantidade da droga liberada.

Inicialmente, a análise dos dados mostrou que os perfis de permeação do sistema binário (F4) seguiu o modelo de difusão proposto por Higuchi, considerando o alto valor do coeficiente de correlação obtido para a curva em questão ($R^2 = 0,940$) – (Tabela 6). Em análise posterior, os valores de fluxo e t_{lag} (tempo necessário para início de permeação) obtidos para a RF (250 µM), a partir das diferentes formulações, foram comparados entre si. A análise estatística mostrou que as formulações F2 e F3

apresentaram menores valores de fluxo ($\sim 0,3 \pm 0,01 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1/2}$), quando comparados a RF isolada ($\sim 0,044 \pm 0,005 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1/2}$), porém com baixos valores de R^2 .

Apesar de todas as formulações seguirem o modelo de Higuchi, observamos que a concentração de RF permeada foi relativamente baixa. Porém, observamos que na formulação F4 ocorre uma liberação do fármaco para o meio receptor após 2 horas de aplicação, sendo que esta liberação tende a aumentar com o passar das horas, chegando ao pico máximo em 6 horas. No entanto, o mesmo não é observado para as outras formulações, bem como para a RF sozinha ($250 \mu\text{M}$), o que indica que a formulação F4 aumenta a permeação da RF para o meio receptor, em relação à RF isolada, sugerindo que a mesma pode facilitar a ação desejada da RF sobre a pele.

Tabela 6: Parâmetros de permeação da Riboflavina através de membrana artificial a partir de diferentes formulações de hidrogéis a base de Pluronic. ALD- Abaixo do limite de detecção.

Formulações	Modelo Ordem Zero		Modelo de Higuchi	
	Fluxo ($\mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	R^2	Fluxo ($\mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1/2}$)	R^2
RF	$0,014 \pm 0,001$	0,844	$0,044 \pm 0,005$	0,845
F1 (PL F127- 25% - RF)	ALD	ALD	ALD	ALD
F2 (PL F127- 30% - RF)	$0,01 \pm 0,004$	0,328	$0,031 \pm 0,013$	0,287
F3 (PL F127- 25% - PL PL123- 5% - RF)	$0,009 \pm 0,004$	0,275	$0,029 \pm 0,012$	0,274
F4 (PL F127- 25% - PL F68- 5% - RF)	$0,151 \pm 0,01$	0,943	$0,483 \pm 0,034$	0,940

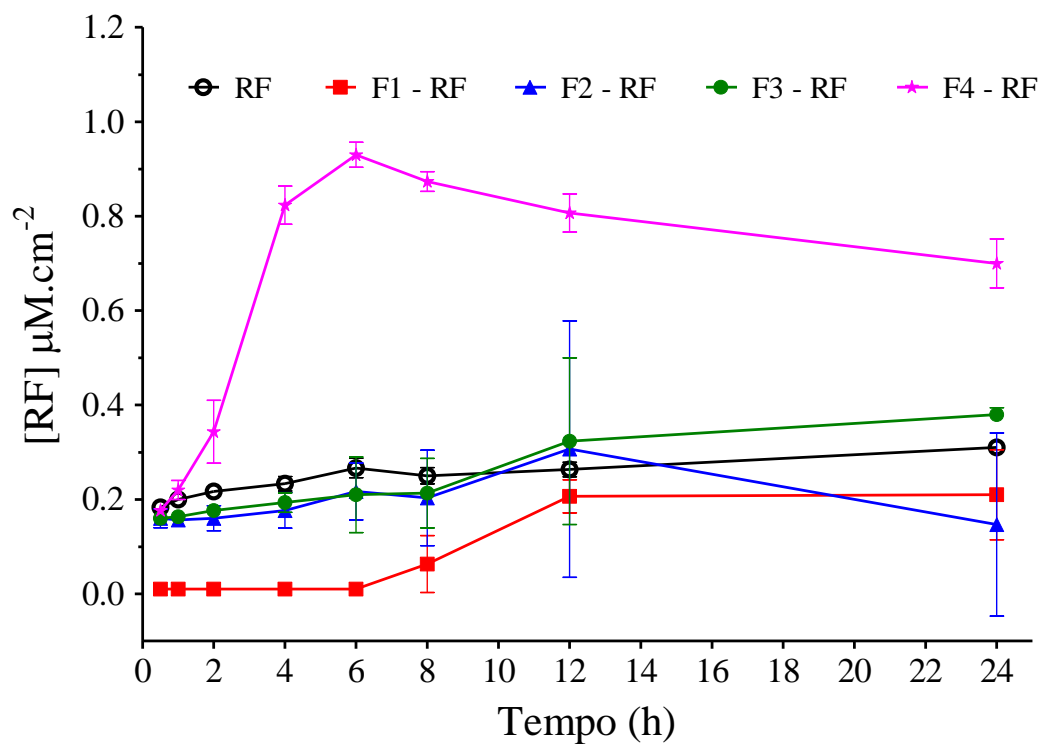


Figura 15: Perfis de permeação obtidos para diferentes formulações contendo Riboflavina, 250 μM , utilizando como modelo de barreira, membrana artificial. Dados apresentados como médias \pm d.p. ($n=3/\text{formulação}$).

Capítulo II

**Avaliação da Responsividade dos Queratinócitos e Células de
Melanoma Frente à Riboflavina e Hidrogéis a Base de Pluronic**

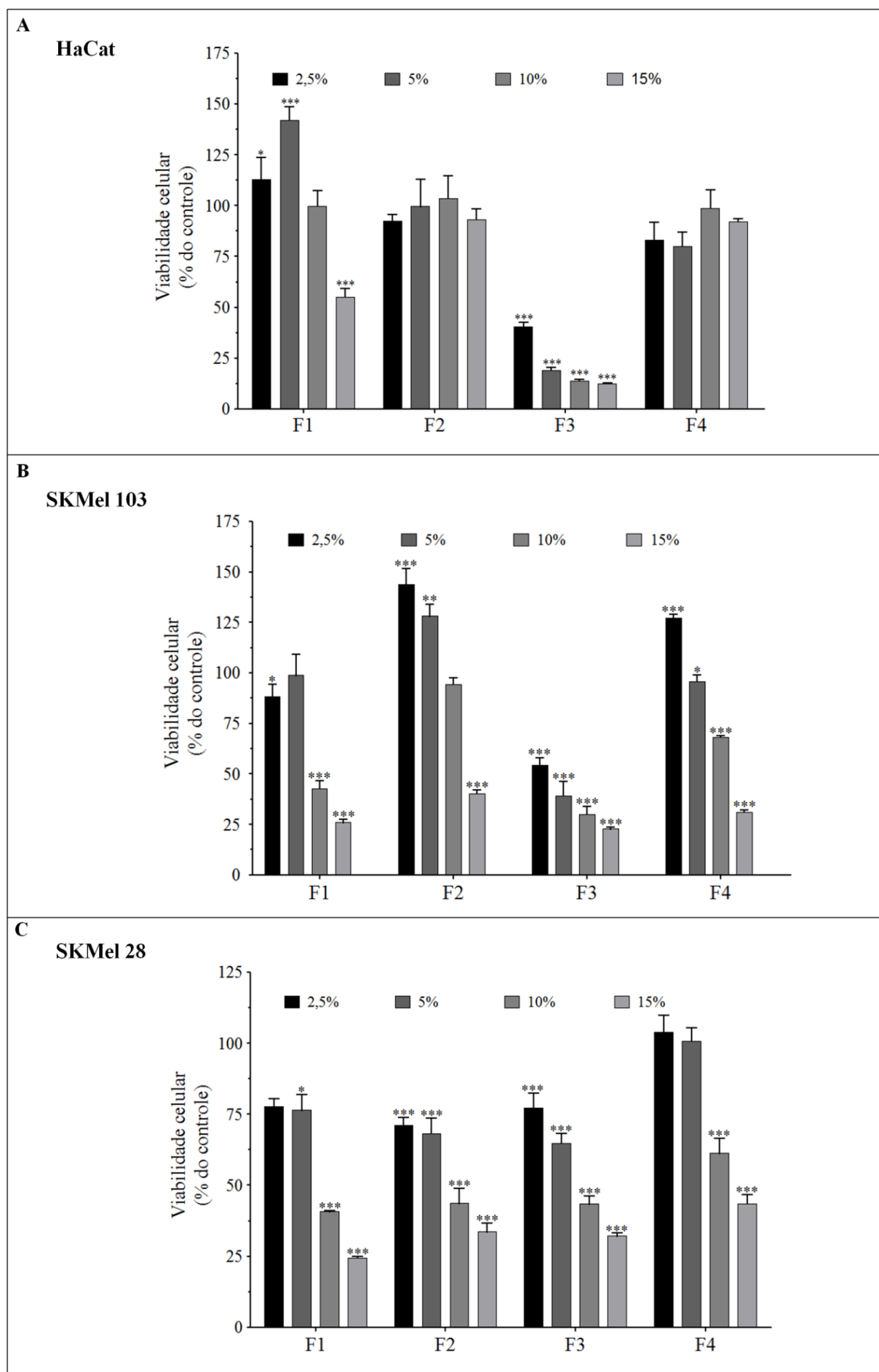
4.6. Avaliação da Responsividade dos Queratinócitos e Células de Melanoma Frente à Riboflavina e Hidrogéis a Base de Pluronic:

4.6.1. Avaliação da Influência das Formulações na Viabilidade dos Queratinócitos e Células de Melanoma.

Inicialmente foi analisada a influência do tratamento, com as formulações, das células de queratinócitos humanos normais (HaCat) e de melanoma (SKMel-103, SKMel-28, SKMel-29 e SKMel-29 PLX-R, resistente ao vemurafenibe) pelo ensaio da redução do MTT (Figura 16A, B, C, D e E). A viabilidade dos queratinócitos humanos não foi afetada pelos hidrogéis F1, F2 e F4 até a concentração de 10%. No entanto, estas células foram bastante sensíveis a F3, cuja viabilidade se manteve em torno de 20- 35% (Figura 16A). A SKMel-103 apresentou sensibilidade frente as formulações F1 e F4, a partir da dosagem de 10%, enquanto para a formulação F2 somente quando a mesma foi utilizada na dosagem de 15% (Figura 16B). Resposta similar foi observada para a SKMel-28 para as 4 formulações, ou seja, toxicidade somente a partir da dosagem de 10%. Importante notar que esta linhagem não foi muito sensível a F3, mesmo quando tratada com a maior dosagem, já que manteve ainda 50% da viabilidade (Figura 16C). A SKMel-29 apresentou perfil de responsividade semelhante a SKMel-28 (Figura 16D). Já a linhagem SKMel-29 PLX-R manteve a viabilidade acima de 75% após o tratamento com todas as formulações (Figura 16E). No entanto, um fato que chamou atenção foi que o tratamento com a F3 ocasionou o surgimento de um grande número de vacúolos intracelular, exclusivamente na SKMel-29 PLX-R. Portanto, esta observação nos levou a investigar mais em detalhes o efeito da F3 nesta linhagem. Os dados estão apresentados no capítulo 3 desta dissertação.

Estes experimentos permitiram estabelecer a utilização das dosagens de 2,5 e 5% das formulações (sem riboflavina incorporada) para continuidade do estudo, uma vez que nestas dosagens as formulações F1, F2 e F4 não comprometeram de forma drástica a viabilidade das células.

A próxima etapa foi avaliar se a riboflavina incorporada nos hidrogéis afetaria a viabilidade das células. Para tal, selecionamos a concentração da riboflavina de 25 μ M (equivalente a 2,5% das formulações), uma vez que nesta dose esta vitamina, na forma livre, não compromete a viabilidade das células utilizadas neste estudo (Figura 17A). Para as formulações F1-RF e F2-RF somente a HaCat apresentou diminuição da viabilidade em torno de 30% (Figura 17B e 17C). No entanto, a formulação F2, sem e com riboflavina incorporada, ocasionou um aumento da redução do MTT na linhagem SKMe1-29 PLX- R (Figura 17C), um indicativo de toxicidade. Já a formulação F3 com e sem riboflavina causou o mesmo perfil de resposta em todas as linhagens (Figura 17D). E no caso da F4 também observamos uma maior redução do MTT na linhagem resistente (Figura 17E), porém, nas demais linhagens a viabilidade se manteve em torno de 70% (Figura 17E).



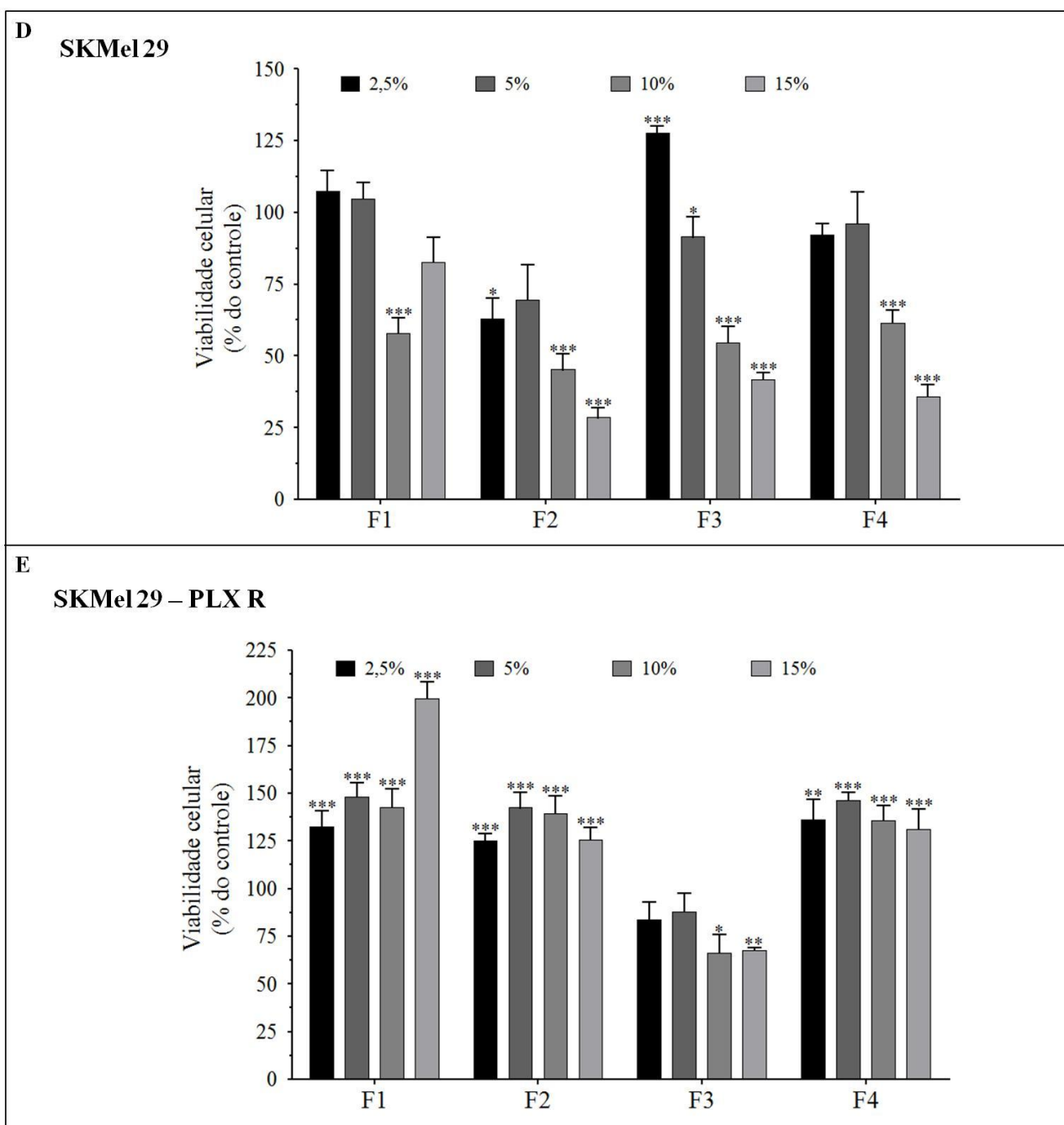
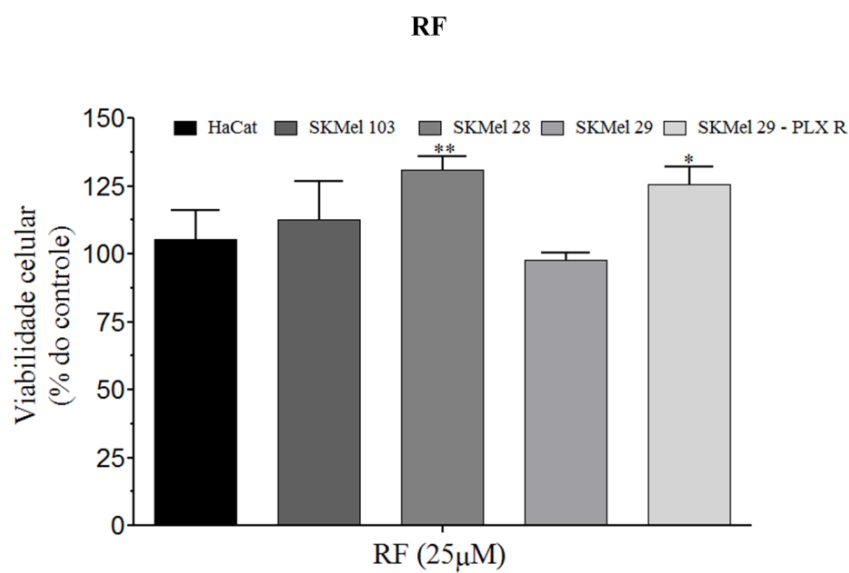
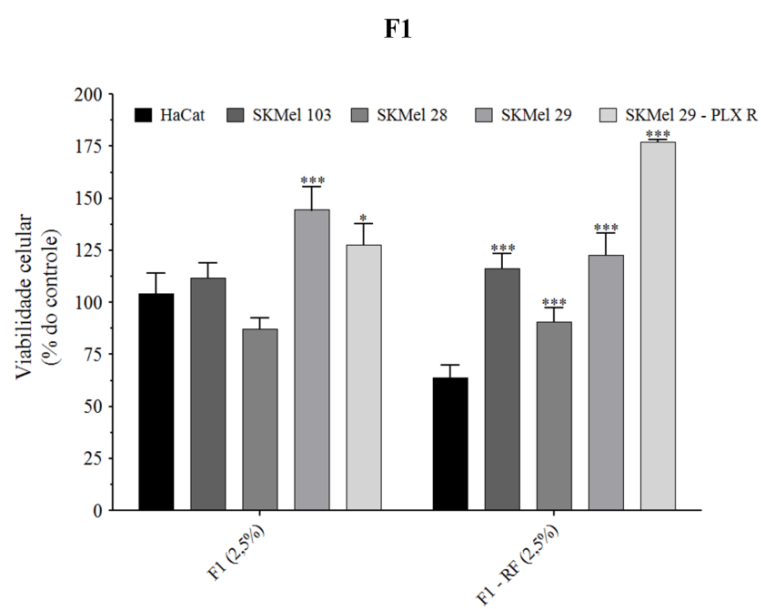
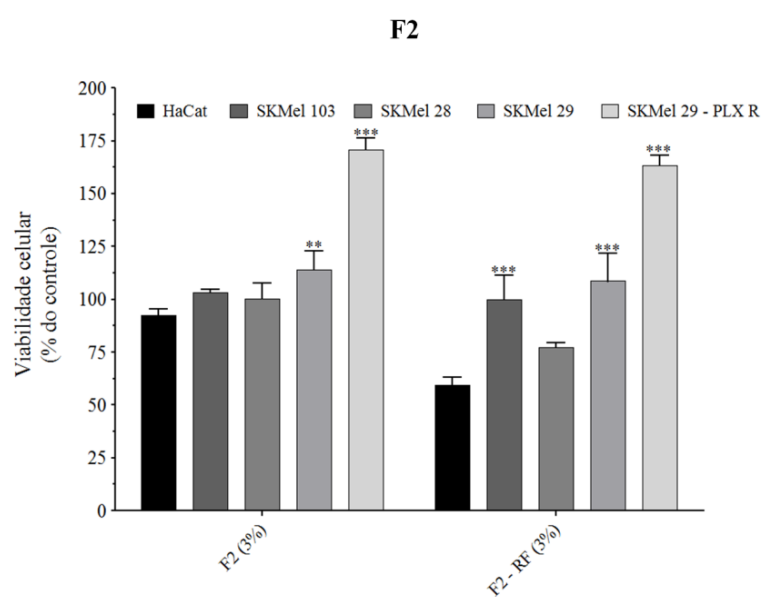


Figura 16: Avaliação do efeito das formulações na viabilidade das linhagens de melanoma e queratinócitos normais. A- HaCat; B- SKmel-103; C- SKmel-28; D- SKMel-29 e D- SKMel-29 PLX- R. Avaliação da citotoxicidade das formulações a base de Pluronic F1; F2; F3 e F4. As formulações foram utilizadas nas concentrações de 2,5 a 15%. Tratamento foi realizado por 24h, em meio DMEM, suplementado com 10% SFB. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (células não tratadas) o qual foi considerado como 100%. Análise estatística realizada pelo método ANOVA, em relação ao controle (n= 4).

A**B****C**

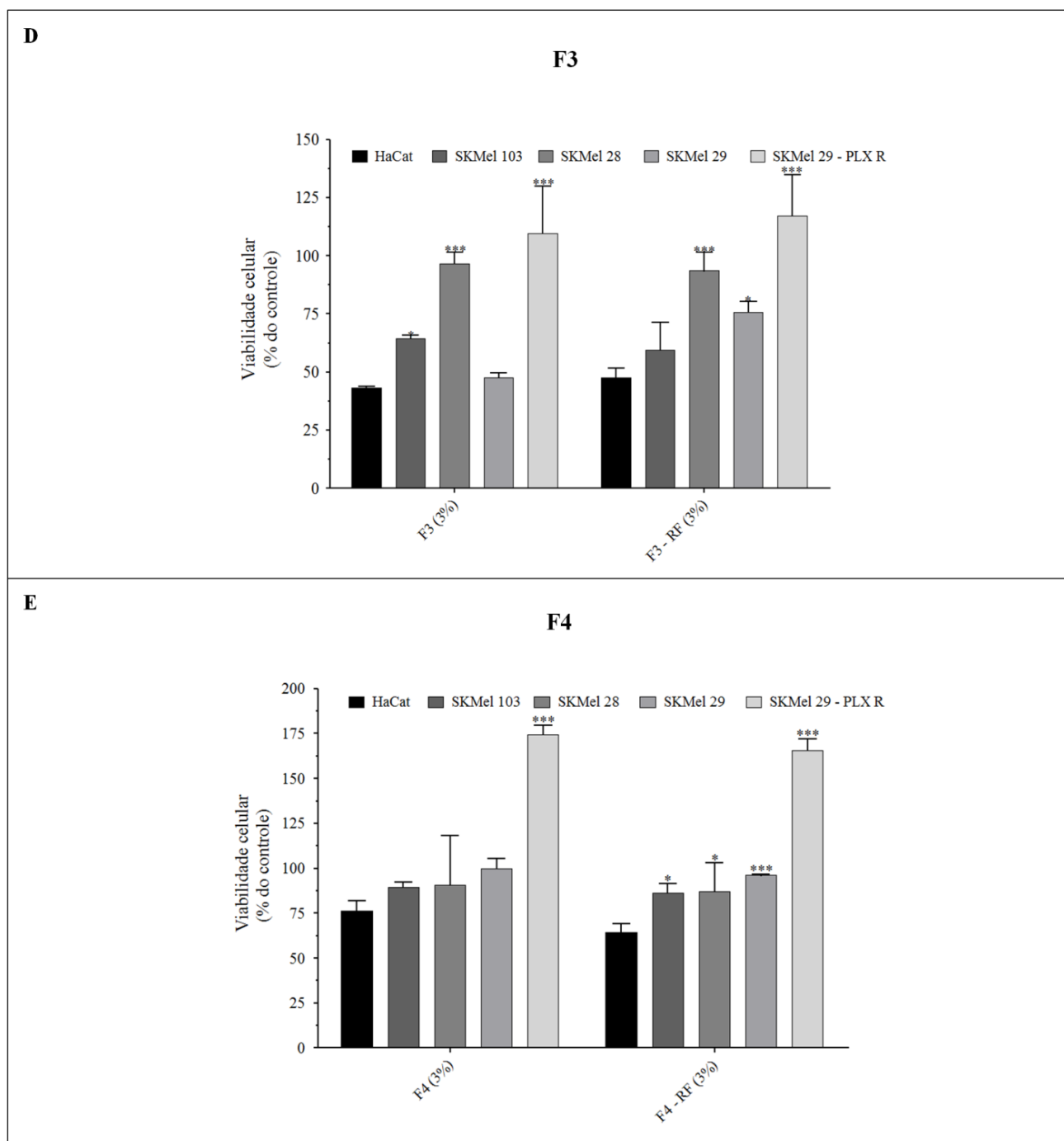


Figura 17: Avaliação do efeito das formulações na viabilidade das linhagens de melanoma e queratinócitos normais. A- Avaliação da Citotoxicidade da RF, 25 μ M; B-C Avaliação da Citotoxicidade dos sistemas isolados (F1 e F2); D-E Avaliação da Citotoxicidade dos sistemas binários (F3 e F4) a base de Pluronic na concentração de 2,5 e 3% com e sem a incorporação de RF. Tratamento realizado por 24h, em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle, não tratado, considerado como 100%. Análise estatística realizada pelo método ANOVA, em relação ao controle de cada linhagem celular (n= 4).

4.6.2. Avaliação da Viabilidade dos Queratinócitos Humanos Normais e Células de Melanoma (SKMel-103) Tratados com Hidrogéis Previamente Irrradiados com Luz Ultravioleta.

Nosso grupo de pesquisa reportou que a irradiação com luz UV da RF leva a obtenção de uma mistura de fotoprodutos capaz de induzir morte de diferentes células tumorais: leucêmicas (Souza et al, 2006), câncer de próstata, melanoma e câncer renal (de Souza Queiroz et al, 2007; Machado et al, 2013; Chaves-Neto et al, 2014). Portanto, tornou-se desafiador o desenvolvimento de uma formulação para administração destes fotoprodutos. Baseando-se nos dados promissores obtidos em experimentos *in vivo* sobre a capacidade da riboflavina inibir metástase do melanoma para o pulmão (Machado et al, 2013) decidimos investir no desenvolvimento de uma formulação para uso tópico.

A partir desta etapa do estudo selecionamos as linhagens de queratinócitos e SKMel-103 para darmos continuidade a investigação da ação biológica dos hidrogéis contendo riboflavina incorporada, seguida de irradiação com luz UV. Esta decisão foi baseada no fato que temos maior experiência para trabalhar com estas linhagens e também por questão de logística, pois seria inviável (por questão do cronograma) realizar todos os experimentos que serão apresentados a seguir, com todas as linhagens. Além disso, os dados obtidos com os queratinócitos e SKMel-103 permitirão direcionar, de forma racional, os experimentos que deverão ser realizados futuramente com as outras linhagens.

A Figura 18 mostra que a incorporação da riboflavina nos hidrogéis (F1, F2 e F4) diminui a toxicidade desta vitamina, quando irradiada, sobre os queratinócitos normais (Figura 18A). Além disso, a formulação F2 contendo riboflavina incorporada e

irradiada com UV não comprometeu a viabilidade dos queratinócitos, analisada pelo ensaio de redução do MTT. No entanto, as células SKMel-103 apresentaram diminuição de 50% da capacidade em reduzir este corante (Figura 18B). A formulação 3 apresentou toxicidade para ambas as linhagens (Figura 18 A-B).

Além disto, analisamos a morfologia das células com aquisição de imagens das linhagens após os tratamentos, as quais foram obtidas em contraste de fase utilizando o equipamento Cytation™ 5. Nota-se que as formulações são capazes de alterar a morfologia, principalmente da linhagem SKMel-103 (Figuras 19-20). Dados em concordância com os apresentados na Figura 18.

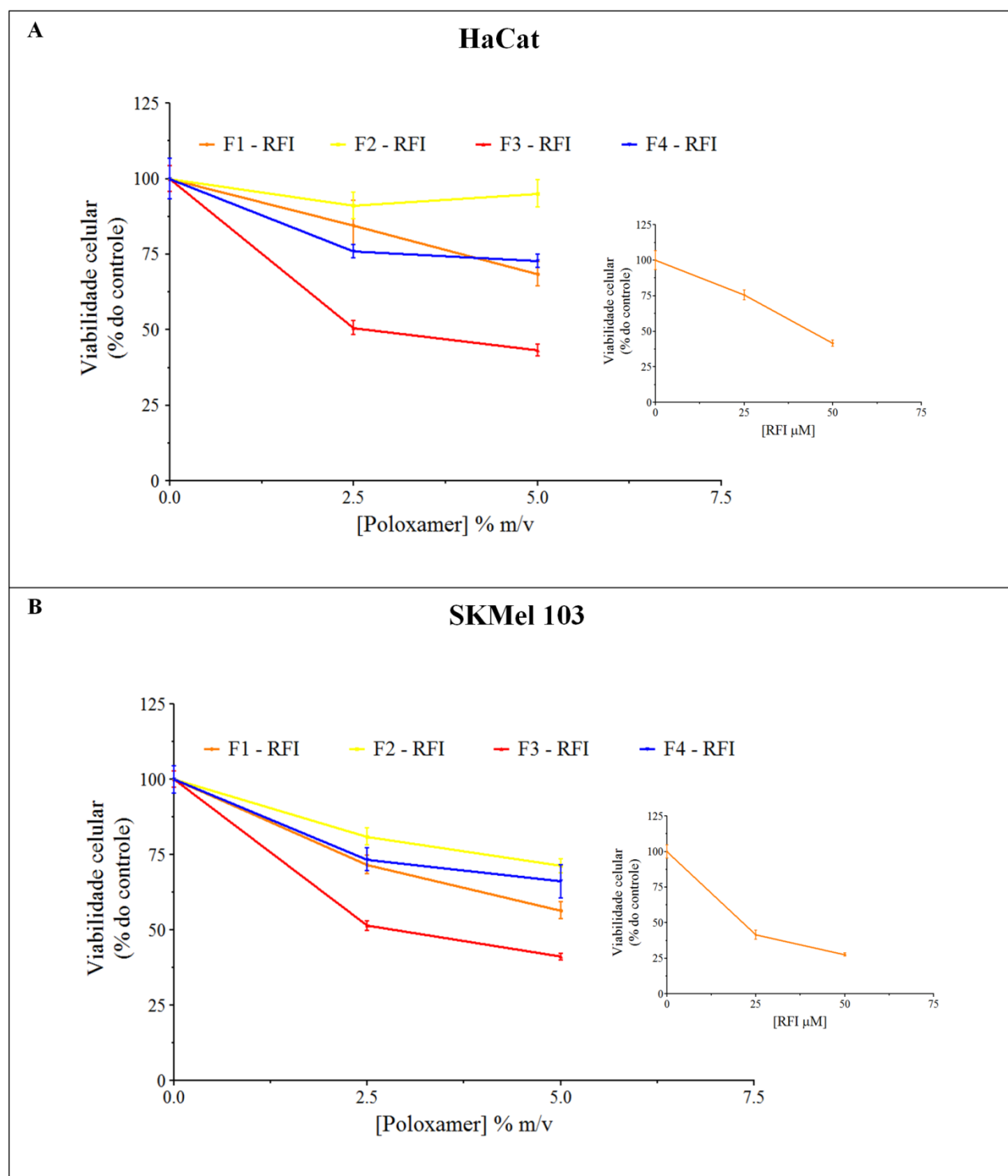
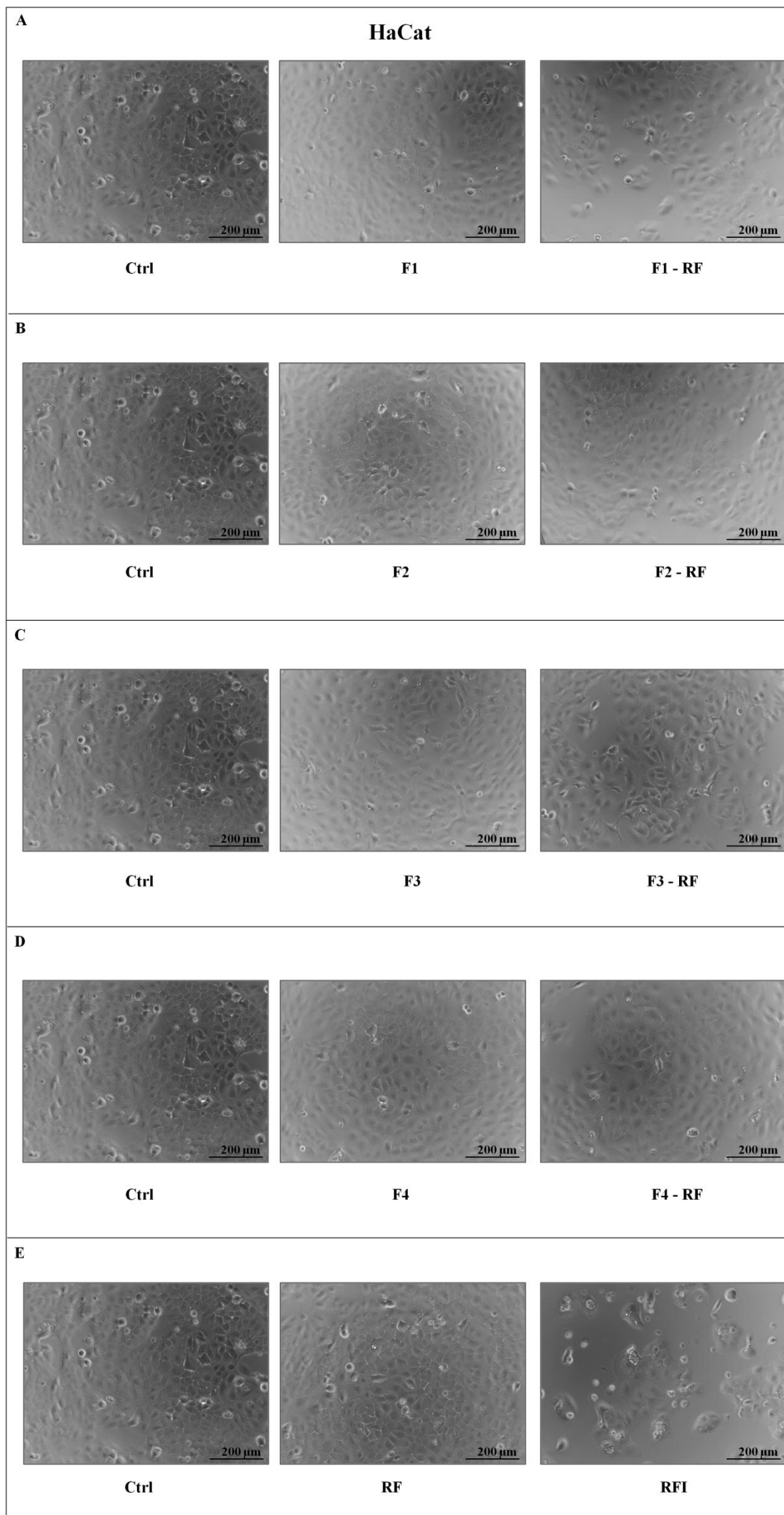


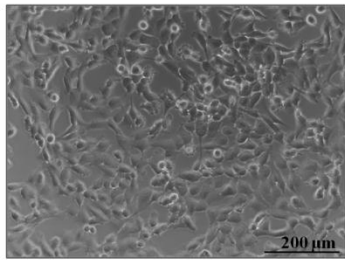
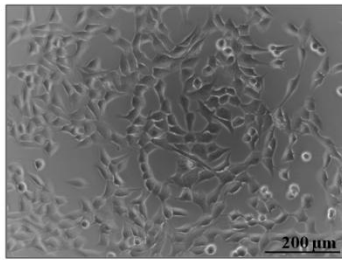
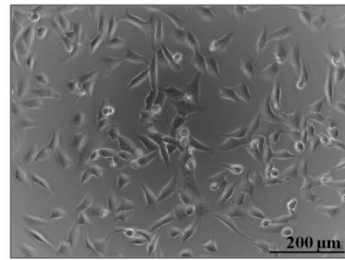
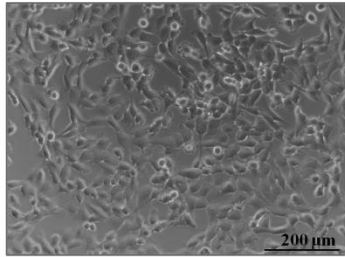
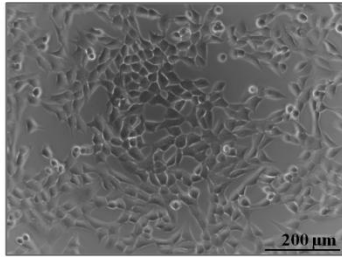
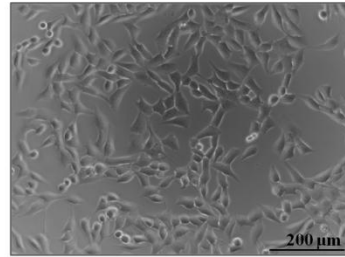
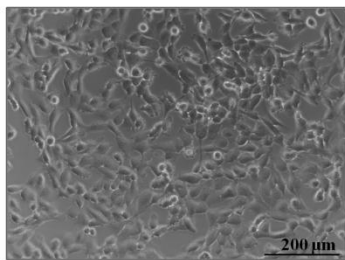
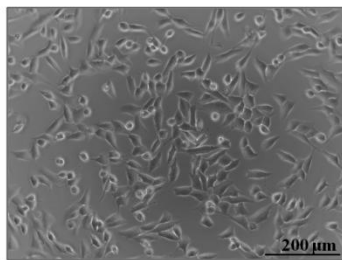
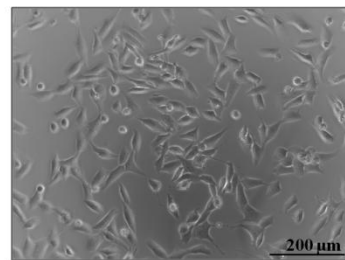
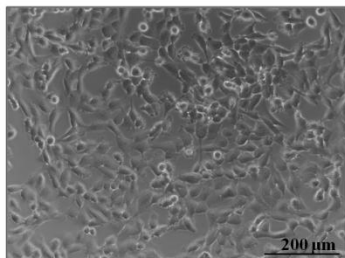
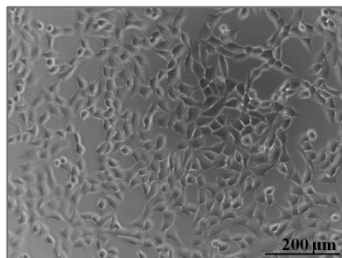
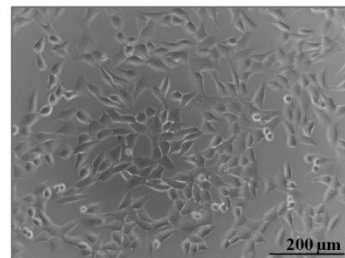
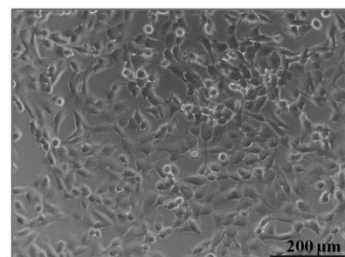
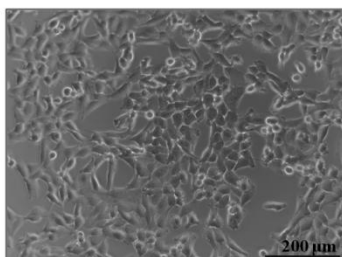
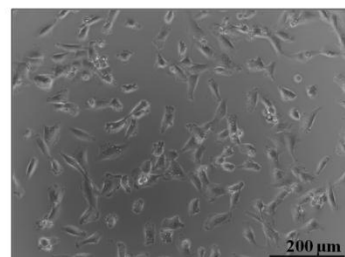
Figura 18: Avaliação do efeito das formulações na viabilidade da linhagem de queratinócitos normais e melanoma, SKMel-103, A-B. Avaliação da Citotoxicidade dos sistemas isolados (F1 e F2) e binários (F3 e F4) a base de Pluronic na concentração de 2,5 e 5% com e sem a incorporação de RF, e RFI isolada na concentração de 25 e 50 μ M, após Irradiação por 30 minutos com luz UV. Tratamento realizado por 24h, em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle, não tratado, considerado como 100%. Análise estatística realizada pelo método ANOVA, em relação ao controle de cada linhagem celular (n= 12).



Figuras 19: Imagens morfológicas da linhagem queratinócitos humanos adquiridas pelo equipamento Cytation™ 5. Tratamento realizado por 24h com sistemas isolados (F1 e F2) binários (F3 e F4) a base de Pluronic na concentração de 5% com e sem a incorporação de RF, e RF isolada na concentração de 50µM, após Irradiação por 30 minutos com luz UV em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Imagens adquiridas por contraste de fase.

A**SKMel 103**

78

**Ctrl****F1****F1 - RF****B****Ctrl****F2 - 30%****F2 - RF****C****Ctrl****F3****F3 - RF****D****Ctrl****F4****F4 - RF****E****Ctrl****RF****RFI**

Figuras 20: Imagens morfológicas da linhagem de melanoma SKMel-103 adquiridas pelo equipamento Cytation™ 5. Tratamento realizado por 24h com sistemas isolados (F1 e F2) binários (F3 e F4) a base de Pluronic na concentração de 5% com e sem a incorporação de RF, e RF isolada na concentração de 50µM, após Irradiação por 30 minutos com luz UV em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Imagens adquiridas por contraste de fase.

4.7. Avaliação da Capacidade das Formulações Induzirem Morte Celular.

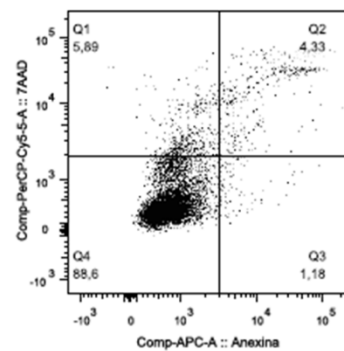
Partindo da premissa que a riboflavina irradiada induz apoptose de células tumorais, incluindo melanoma (Souza et al, 2006; de Souza Queiroz et al, 2007; Machado et al, 2013; Chaves-Neto et al, 2014). Investigamos se as formulações com e sem riboflavina incorporada, seguida de irradiação com UV, seriam capazes de induzir apoptose nas células SKMel-103. Para isso, após 24 h de tratamento com as formulações a base de Pluronic (5%) correspondendo à 50µM de riboflavina, as células foram marcadas com Anexina- V e 7- AAD e analisadas por citometria de fluxo. Nessas análises, as células viáveis apresentam marcação negativa tanto para Anexina- V como para 7-AAD, enquanto as células em apoptose apresentam marcação positiva apenas para Anexina- V, já as células em apoptose tardia apresentam dupla marcação positiva para Anexina- V e para 7- AAD, e em necrose apresentam marcação positiva apenas para 7- AAD.

Na Figura 21 podemos observar que a incorporação da RF nas formulações F1 e F2 resultou em uma tendência em melhorar a capacidade de indução de morte das células de melanoma, quando comparamos as formulações sem RF. Principalmente quando observada a ação da F1- RF, pois a quantidade de células em necrose foi menor. Estes dados nos levam a hipotetizar que o efeito da F1- RF seria mais pronunciado em um tratamento por um período maior. A toxicidade da F3 também foi confirmada nesta análise, como atestada pela alta porcentagem de células em apoptose tardia. A F4 teve

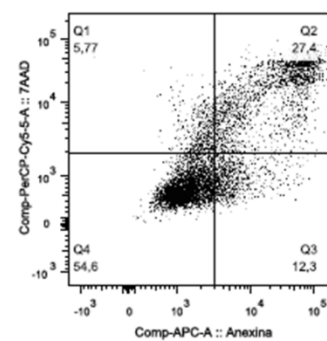
uma ação similar à RF livre, no que se refere a apoptose tardia, no entanto, causou um nível de necrose maior.

A análise de citometria foi crucial para nos auxiliar na seleção das formulações para dar continuidade ao estudo. Partindo da premissa que a baixa capacidade de indução da necrose é uma característica desejável a um candidato a fármaco, nos próximos experimentos que envolveram análise da influência das formulações na expressão de mediadores moleculares relacionados com sobrevivência e ciclo celular, as formulações F1 e F2 foram utilizadas no tratamento das células.

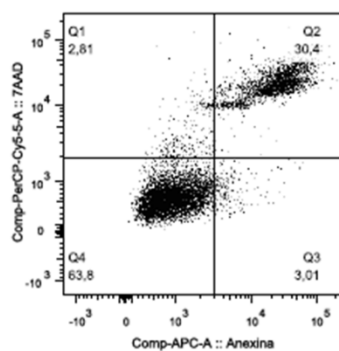
Formulações Irradiadas



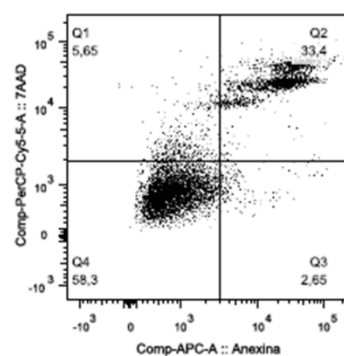
Ctrl



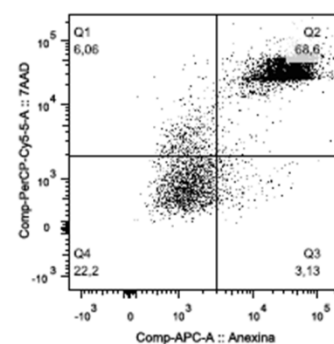
RFI - 50 µM



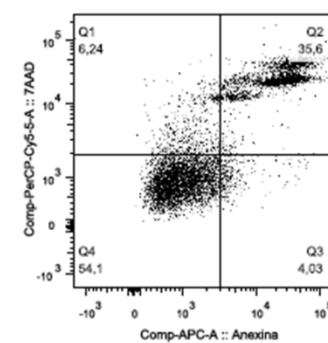
F1



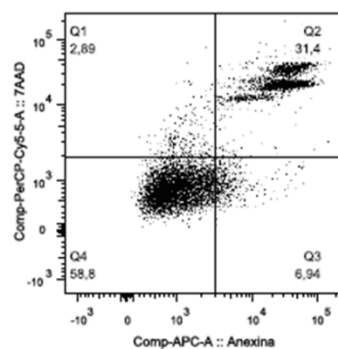
F2



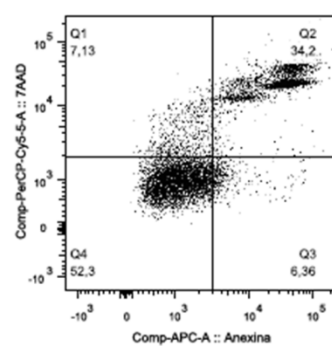
F3



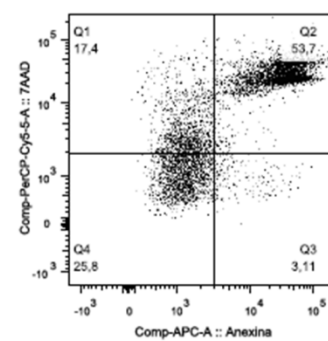
F4



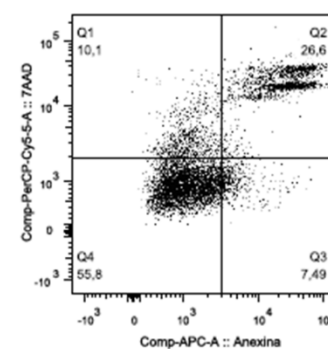
F1 - RFI



F2 - RFI



F3 - RFI



F4 - RFI

Figura 21: Análise da indução de morte celular. As células SKMel-103 foram tratadas com riboflavina livre (50 μ M), com 5% dos hidrogéis sem e com riboflavina incorporada (concentração da riboflavina também equivalente a 50 μ M). A porcentagem de células viáveis, em apoptose, apoptose tardia e necrose foi determinada a partir da marcação das células com 7-AAD e Anexina, após 24h de tratamento.

4.8. Responsividade das Células SKMel-103 sob o Aspecto Molecular Frente ao Tratamento com Hidrogéis: Reguladores do Ciclo Celular.

Proteínas envolvidas no ciclo celular (ciclina D, p21 e p18) foram avaliadas quanto a sua modulação pelas formulações. Ciclinas D, as quais incluem as ciclinas D1, D2 e D3, formam complexos ativos com CDK4 ou CDK6 (Quinases Dependentes de Ciclina), os quais tem como principal função a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) conduzindo a progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Kato e Sherr, 1993). Ciclinas D co-ordenam a progressão do ciclo celular por meio de estimulação extracelular (por exemplo, disponibilidade do fator de crescimento, disponibilidade de nutrientes e a sinalização de adesão derivada de integrinas) (Coleman e Marshall, 2001). Dado o relevante papel das ciclinas D na mediação de sinais extracelulares como proliferação celular, não é surpreendente que a super-expressão das ciclinas D ou a hiperativação das suas CDKs cognatas contribuam diretamente para o crescimento de células tumorais. Mais especificamente, a ciclina D1 tem atraído atenção devido à prevalência da sua desregulação nos cânceres humanos (Musgrove, et al., 2011). De acordo com a Figura 22, o tratamento com as formulações F1 e F1- RF causou redução nos níveis de expressão da ciclina D, indicando uma possível parada de ciclo celular na fase G1 para a fase S. De forma interessante, F2 diminuiu a quantidade da ciclina D1, mas quando a RF foi incorporada neste hidrogel, o nível desta ciclina retornou ao mesmo nível presente no grupo controle.

Estudos demonstraram que a atividade de CDK é controlada por inibidores de CDK (CKIs - Inibidores de Quinase dependente de Ciclina) tais como CIP / KIP e INK. A família de inibidores CIP/KIP incluem p21, p27 e p57, já a família INK compreende proteínas p15, p16, p18 e p19. Os membros da família INK ligam-se a CDK4 e CDK6 e bloqueiam a sua interação com ciclina D, são considerados específicos. Os membros da família CIP/KIP, inespecíficos, ligam-se a ciclina A, E, D/ CDK e suprimem a sua atividade catalítica levando a parada do ciclo celular (Lee, et.al. 2009; Yagi, et.al. 2003; Wu, et.al. 2003). Desta forma avaliamos tanto os inibidores da família INK, p18, quanto da família CIP/KIP, p21, após o tratamento com as formulações irradiadas com e sem RF incorporada. Observamos que o tratamento com F1 e F2 com e sem RF incorporada, após irradiação com luz UV, modulou negativamente a expressão de p18. Já para a proteína p21 (Figura 22) o tratamento promoveu um aumento na sua expressão, principalmente com relação ao sistema composto por F2 com RF incorporada, levando a uma modulação significativamente maior em relação ao controle. p21 é um inibidor bem conhecido do ciclo celular e pode bloquear a progressão do ciclo nas transições G1/S e G2/M por inibição de CDK4, CDK6/ciclina-D e CDK2/ciclina-E, respectivamente. Acredita-se que a regulação do crescimento celular por p21 é mediada pelo controle da atividade de E2F (Wang, et.al. 2011; Bertoli, et.al. 2013; Zaldua, et.al. 2016).

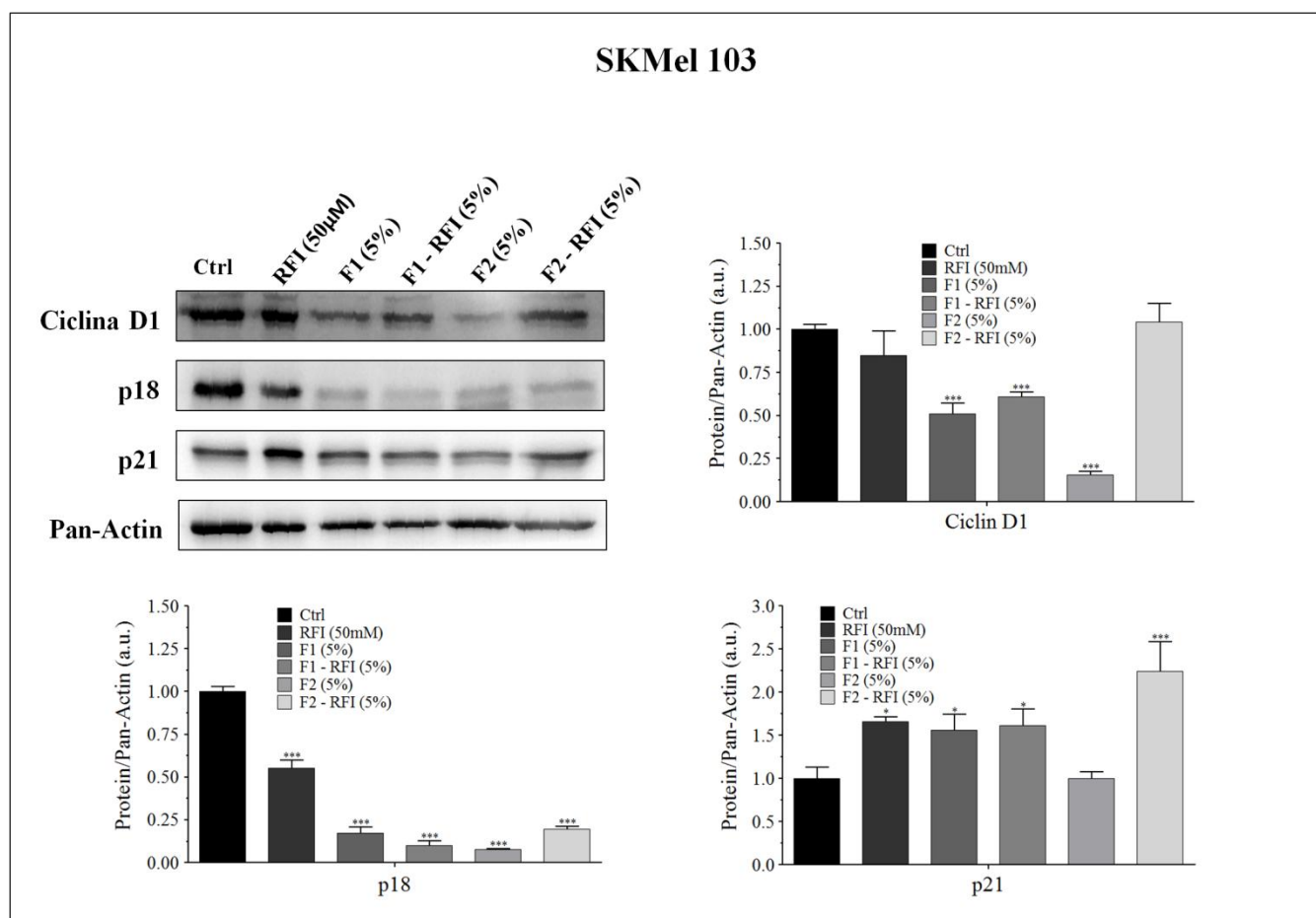


Figura 22: Formulações F1, F2 isolados e após incorporação de RF, irradiados com luz UV, modula a expressão de proteínas associadas com a proliferação celular de células SKMel-103. A expressão de Ciclina D1, p18 e p21 foi determinada por *Western blotting*. A proteína Pan-Actin foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos *blottings*. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.). ANOVA seguido por teste de *Tukey*.

Com relação a proteínas envolvidas no processo de morte celular por apoptose, avaliamos a modulação de proteínas pró-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-2, após o tratamento com as formulações irradiadas. Como pode ser observado na Figura 23, a razão Bax/Bcl-2 aumentou significativamente após o tratamento das células com a formulação F1- RF (5%), após irradiação. Efeito similar, porém com menor intensidade, foi observado nas outras condições de tratamento.

O desequilíbrio entre os níveis de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas conduz à ativação da apoptose por perturbar a integridade da membrana mitocondrial

(Adams e Cory, 2007), provocando a liberação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria para o citoplasma. Dado corroborado, pelo incremento dos níveis de PARP-1 clivada (Poli ADP- ribose polimerase-1) observado para os tratamentos com as formulações, em especial para F2 com RF incorporada e irradiada por 30 minutos, reforçando mais uma vez a indução de morte celular por apoptose.

Além disso, foi analisado um dos marcadores de autofagia, a proteína p62 (Figura 23). A degradação desta proteína é dependente da autofagia, portanto, o nível de p62 aumenta em resposta à inibição da autofagia (Bjorkoy, et.al. 2005). No presente estudo observamos que a expressão de p62 está aumentada em relação ao controle, para os tratamentos com as formulações irradiadas a base de Pluronic, indicando que o processo autofágico está inibido. Fato que pode contribuir para a sensibilização das células para morte por apoptose.

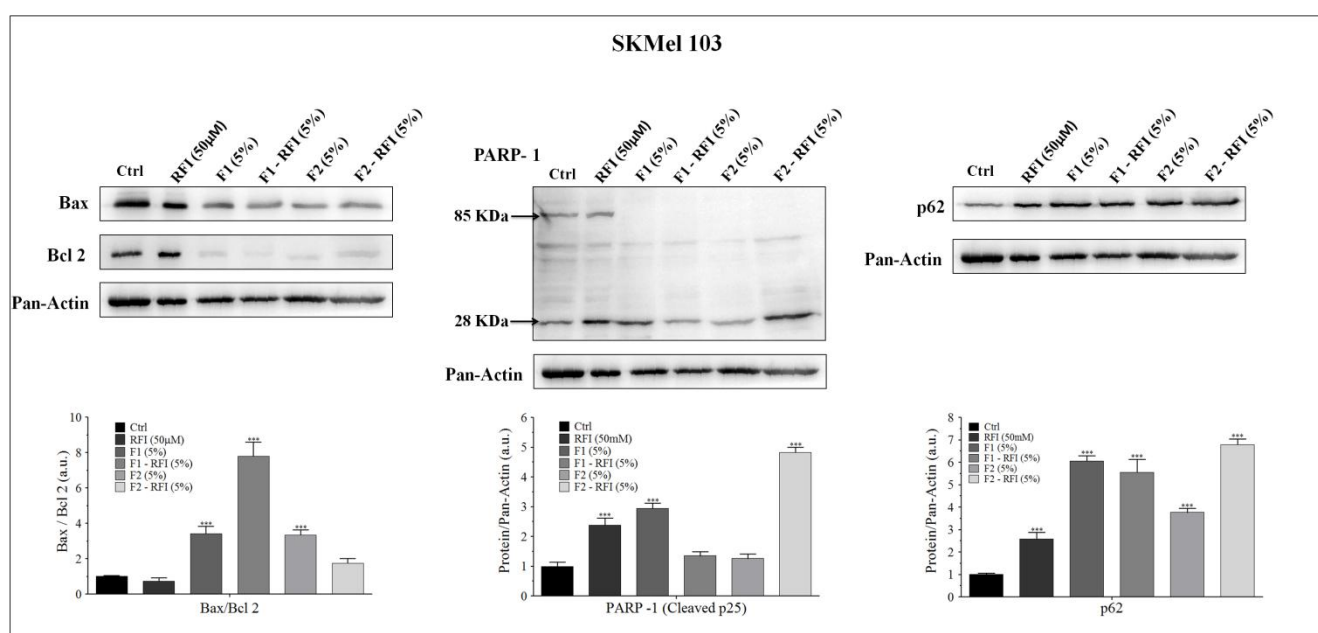


Figura 23: Formulações F1, F2 isolados e após incorporação de RF, irradiados com luz UV, modula a expressão de proteínas associadas com morte celular por apoptose de células SKMel-103. A expressão de Bax, Bcl2, PARP-1, p62 foi determinada por *Western blotting*. A proteína Pan-Actin foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos *blottings*. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.). ANOVA seguido por teste de *Tukey*.

Capítulo III

**Pluronic F127/P123 binary system switches survival pathways
off in melanoma cells resistant to BRAF inhibitor**

Pluronic F127/P123 binary system switches survival pathways off in melanoma cells resistant to BRAF inhibitor

Marina Dias Pereira^a, Karin J. P. Rocha-Brito^a, Fernanda Faião-Flores^b, Silvy Stuchi Maria-Engler^b, Daniele Ribeiro de Araujo^c, Carmen V. Ferreira-Halder^{a,*}

*Corresponding author address: Laboratory of *In vitro* Biossays and Signal Transduction/Oncobiomarkers, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Biology Institute, University of Campinas. Monteiro Lobato street, 250, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: carmenv@unicamp.br (C.V. Ferreira-Halder).

Author names and affiliations:

^aDepartment of Biochemistry and Tissue Biology, Biology Institute, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

^bDepartment of Clinical Chemistry & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^cHuman and Natural Sciences Center, ABC Federal University, Santo André, SP, Brazil.

Statistical summary:

Total number of words: 4827

Tables: 1

Figures: 5

Abstract

Drug resistance remains a great challenge in cancer treatment and represent an area of increasing attention in the case of melanoma. In this study, we have evaluated a Pluronic[®]-based hydrogel composed of two polymers with different hydrophilic-lipophilic balances (HLB), such as PL F127 (and PL P123). Interestingly, we noticed that PL F127/P123 binary system displays toxicity in melanoma resistant to the BRAF inhibitor (BRAFi) vemurafenib, as shown by morphological alterations and decreased cellular viability. Interestingly, treatment of BRAFi resistant SKMel29 induced an autophagy flux inhibition which possibly triggered the apoptotic process observed, as seen by an increase of cleaved PARP 1. Importantly, AKT, kinase associated with resistance phenotype was downregulated after treatment. In the present study, we show that Pluronic hydrogel switches off two important signaling pathways in resistant melanoma, AKT and autophagy, and in turn, sensitizes melanoma cells to vemurafenib treatment. Since Pluronic[®] are employed as drug delivery systems, it may be a good strategy to develop a PL F127-PL P123 formulation for controlled release of vemurafenib. Therefore, Pluronic would have two functions a) to sensitize melanoma cells that are addicted to autophagy, by blocking this process; and b) to deliver vemurafenib.

Keywords: Melanoma; Vemurafenib; Pluronic; BRAFi resistant SKMel29

1. Introduction

The incidence of melanoma has been continuously increasing over the past decades. The latest American Cancer Society report states that about 87,110 new melanoma cases will be diagnosed and about 9,730 people will be expected to die of melanoma in 2017[1]. Patients with advanced melanoma have traditionally very poor prognosis. However, better understanding of the biology of this cancer has revolutionized its treatment. For instance, BRAF inhibitors (vemurafenib, dabrafenib) have shown benefit in terms of overall survival compared to traditional chemotherapy. Their combination with MEK inhibitors has recently been shown to improve progression-free survival, compared with monotherapy with BRAF inhibitors [2]. However, almost 20% of patients initially do not respond, due to intrinsic resistance to therapy and, of those who do, most eventually develop mechanisms of acquired resistance due to a variety of molecular mechanisms such as: reactivation of the MAP kinase pathway, persistent activation of receptor tyrosine kinase receptor, activation of phosphatidylinositol-3 kinase, overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and hedgehog transcription factors (Gli 1 and Gli2), downregulation of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), and interactions with the tumor microenvironment, for instance, upregulation of metaloproteinase 2 was recently reported in vemurafenibe resistant melanoma [3-8].

Pluronic block copolymers (also known as Poloxamers) consist of hydrophilic poly(ethylene oxide) (PEO) and hydrophobic poly(propylene oxide) (PPO) blocks arranged PEO-PPO-PEO as an A-B-A-type structure. Pluronic (PL) have been investigated as drug-delivery systems, showing promising results concerned to the improvement of biopharmaceutics, pharmacodynamics and pharmacokinetics properties of the incorporated drugs. One of the main advantages of the PL is their capability of forming gels close to the body temperature, due to their self-assembly in micelles [9]. Kabanov's group and others reported that some synthetic polymers, *per si*, alter specific cellular responses, such as cellular ATP requirements and the possible reversion of MDR phenotype (for a detailed review see) [10, 11]. We now demonstrated another biological function of Pluronics®, inhibition of autophagy process. Specifically, a binary system composed of two PL with different hydrophilic-lipophilic balances (HLB) and PEO:PPO ratio, such as PLF127 (HLB = 22, PEO:PPO = 3:1) and PLP123 (HLB = 8, PEO:PPO = 1:1.8) [12] - were used. Our findings revealed that this binary system (PL F127-PL P123) blocked the autophagy, as proved by an increase of p62 protein level. Importantly, autophagy and AKT inhibition by PL F127-PL P123 sensitize resistant melanoma cells to vemurafenib.

2. Materials and methods

1.1. Materials

Reagents for western blotting were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Primary and HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA): Beclin (Cat. N° #37385), p-Beclin (Ser 93/96) (Cat. N° # 124765), AKT (Cat. N° # 29385); Santa Cruz (St. Louis, MO, USA): GAPDH (Cat. N° 32233) and p62 (SQSTM1) D3 (Cat. N° 28359); Protein Tech (Chicago, USA): LC3 B (MAP1) (Cat. N° 18725-1); Upstate: PARP -1 (Cleaved p25) (Cat. N° 04-576); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): pAKT (Ser 473) (SAB4300042). MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide), Pluronic F127 (MW 12600 Da, PL F127) and Pluronic P123 (MW 5750 Da, PL P123) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Vemurafenib was from Cayman chemical. Salts and other reagents were of analytical grade.

1.2. Micelles preparation and physico-chemical characterization

For *in vitro* assays, micelles were prepared from PL solutions composed of PL F127 (at 25 % m/v) isolated or in binary system with PL P123 were filtered using a polycarbonate membrane (pore 0.22 μm). The micellar hydrodynamic diameter and the size average distribution were determined using a particle analyzer NanoSeries Zetasizer ZS (Malvern®, UK) at a fixed angle of 173° and temperatures of 25° and 37 °C, in order to simulate the micelles behavior at room and physiological temperature. All measurements were determined at least five times for each sample and data were presented as mean and standard deviation.

1.3. Melanoma cells culture

Melanoma cell line SKMel-29, which carries the BRAF^{V600E} mutation, was kindly donated by Dr. Marisol Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Madrid, Spain). To derive a vemurafenib-resistant cell line (SKMel-29R), SK-Mel-29 cells were seeded at a low cell density (1×10^4 cells/60 mm plate) and treated with 0.5-6 μM vemurafenib every 3 days for 4–6 weeks; then clonal colonies were isolated [6, 7, 13]. BRAFi resistant SKMel-29 melanoma cells were routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS), in a 5% CO₂ humidified atmosphere, at 37 °C.

Melanocytes isolation and culture - This study was approved by the Ethics Committee of the School of Pharmaceutical Sciences – University of Sao Paulo (Process n. 943/09). Experiments were performed with human primary skin melanocytes, extracted from the foreskin of two unrelated Caucasian donors (4- and 6-years of age) as described by [14]. Melanocytes were cultured with 254CF medium supplemented with calcium chloride 0.2 M and Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS, Gibco, Invitrogen Cell Culture, USA), with the addition of Ampicillin and Streptomycin 100 mg/L. After plating, cells were maintained in a humidified incubator at 5% CO₂ and 37 °C. Cells were cultured separately and pooled with equal proportions of both donors at the time of assay plating, in an effort to increase genetic diversity.

2.4. Treatment of melanoma cells

BRAFⁱ resistant SKMel-29 melanoma cells (100 mL of 7×10^4 cells/mL suspension) were cultured in a 96-well microplate for 24 h; subsequently the cells were treated with hydrogel and vemurafenib (treatment description is detailed in the results section). Cell viability was assessed by MTT reduction assay and light field microscopy analyses. For MTT assay treatment medium was removed and the cells incubated with 100 µL/well of MTT solution (0.5 mg/mL, in FBS free culture medium) for 2 h at 37°C. Hereafter, the MTT solution was removed and the formazan produced was dissolved with 100 µL of ethanol. Microplate was shaken for 10 min and the absorbance of formazan was determined at 570 nm in a microplate reader (Synergy HT, BioTek) [15]. The measured absorbance at 570 nm was normalized to percentage of control. This value was calculated by multiplying the absorbance of a treated well by 100 and dividing it by the average absorbance of control wells. Microscopic images by phase contrast were acquired in Cytation 5TM Cell Imaging Multi-Mode Reader (Bio Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

2.5. Western blotting

BRAFⁱ resistant SKMel-29 melanoma cells were cultured in 100 mm plates for 24 h and treated for more 24h. After the treatment, cells were removed from plates, centrifuged and lysed for 2 h on ice in cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM o-vanadate, 1 mM NaF, 1 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin and 1 mM PMSF). Then, the cell lysate was cleared by centrifugation and the protein concentration was determined using Bradford reagent (Sigma-Aldrich). An equal volume of 2x sodium

dodecyl sulfide (SDS) gel loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol - DTT, 4% SDS, 0,1% bromophenol blue and 20% glycerol) was added and the samples were boiled for 5 min. An amount corresponding to 40 mg of protein was resolved by SDS-polyacrylamide gel (8-12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked in bovine serum albumin (5%) in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4 °C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilutions. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies at 1:10000 dilutions for 2 h. Detection was performed by enhanced chemiluminescence in ImageQuant™ 350 (GE healthcare Life Sciences).

2.6. *Statistical analysis*

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) combined with Tukey's or Bonferroni's tests. A P value < 0.05 was considered to be statistically significant with *** = $P < 0.001$, ** = $P < 0.01$ and * = $P < 0.05$. n.s. means "not significant".

3. Results

3.1. Physico-chemical characterization of the binary system (PL F127-PL P123)

The micelles formation was assessed by micellar hydrodynamic diameter and size distribution parameters using the Dynamic Light Scattering (DLS) technique, at two different temperatures (25° and 32.5°C). At 25°C, the micelle hydrodynamic diameter was 35.9 ± 0.6 nm, which was reduced for 26.4 ± 1.6 nm, when the temperature reached 32.5°C. Both experimental conditions presented 100% of size distribution, being unimodal systems with low polydispersity index values (from 0.2 to 0.26 at 25°C and 32.5°C, respectively) - (Table 1).

Table 1. Mean diameter and mean micellar distribution of the PL F127-PL P123 system at temperatures of 25 °C and 32,5 °C.

Formulation	25°C		32.5°C	
	Mean Diameter (nm)	Mean Distribution (%)	Mean Diameter (nm)	Mean Distribution (%)
PL F127 - PL P123	35.9 ± 0.6	100	26.4 ± 1.6	100
(5:1)	0	0	0	0

3.2. Antimelanoma action of binary hydrogel system (PL F127-PL P123)

The cell viability was assessed by counting, MTT reduction and microscopy analyses. Treatment of BRAFi resistant SKMel-29 melanoma cells with the binary system (3%) caused a strong drop (62%) in the cell number as shown in the Figure 1A. When the cell viability was assessed by MTT reduction the viability decreased 25% when the binary system was used at 3% and this effect remained almost the same up to 15% of the formulation (Figure 1B).

Interestingly, microscopy analyses revealed a lot of vacuoles in treated BRAFi resistant SKMel-29 melanoma cells with 3% of binary system, but not in normal human keratinocytes HACAT (Figure 2 A and B). This finding prompted us to examined the occurrence of autophagy process. Indeed, we observed an increase of both LC3I and LC3II after treatment in the melanoma cells (Figure 3A). In addition, treated cells display an increase of two-fold of Beclin phosphorylation, as seen in the ratio between the phosphorylated beclin at activation sites (Ser93/96) and total beclin (Figure 3A). Both findings and the vacuoles observed in treated cells (Figure 3B) indicated that

autophagy process could be occurring. However, cells treated with hydrogel presented a dramatic increase of p62 protein (Figure 3C), which is recognized as indicative of the autophagy flux since is scavenged by sequestration in autophagosome and degraded in sequence [16]. Altogether, these findings indicate that poloxamers inhibits autophagy process contributing significantly to induce cell death in melanoma cell. Moreover, treatment of BRAFi resistant SKMel-29 melanoma cells with PL F127-PL P123 induced apoptosis by PARP-1 cleavage (Figure 3D).

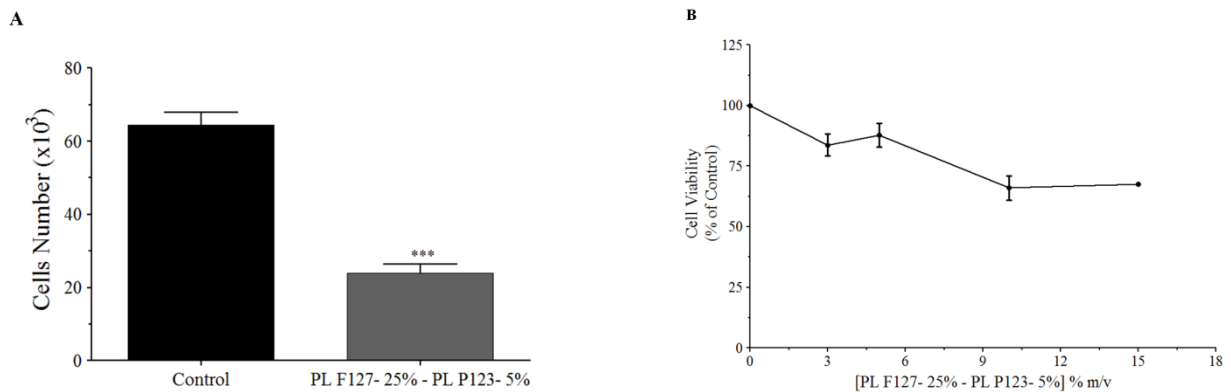


Figure 1: Viability of BRAF inhibitor resistant melanoma cells decreases by treatment with Pluronic binary system (PL F127- 25% - PL P123- 5%). Cells were treated with 3% of binary system for 24h. Cellular viability was assessed by counting (A) and MTT reduction (B).

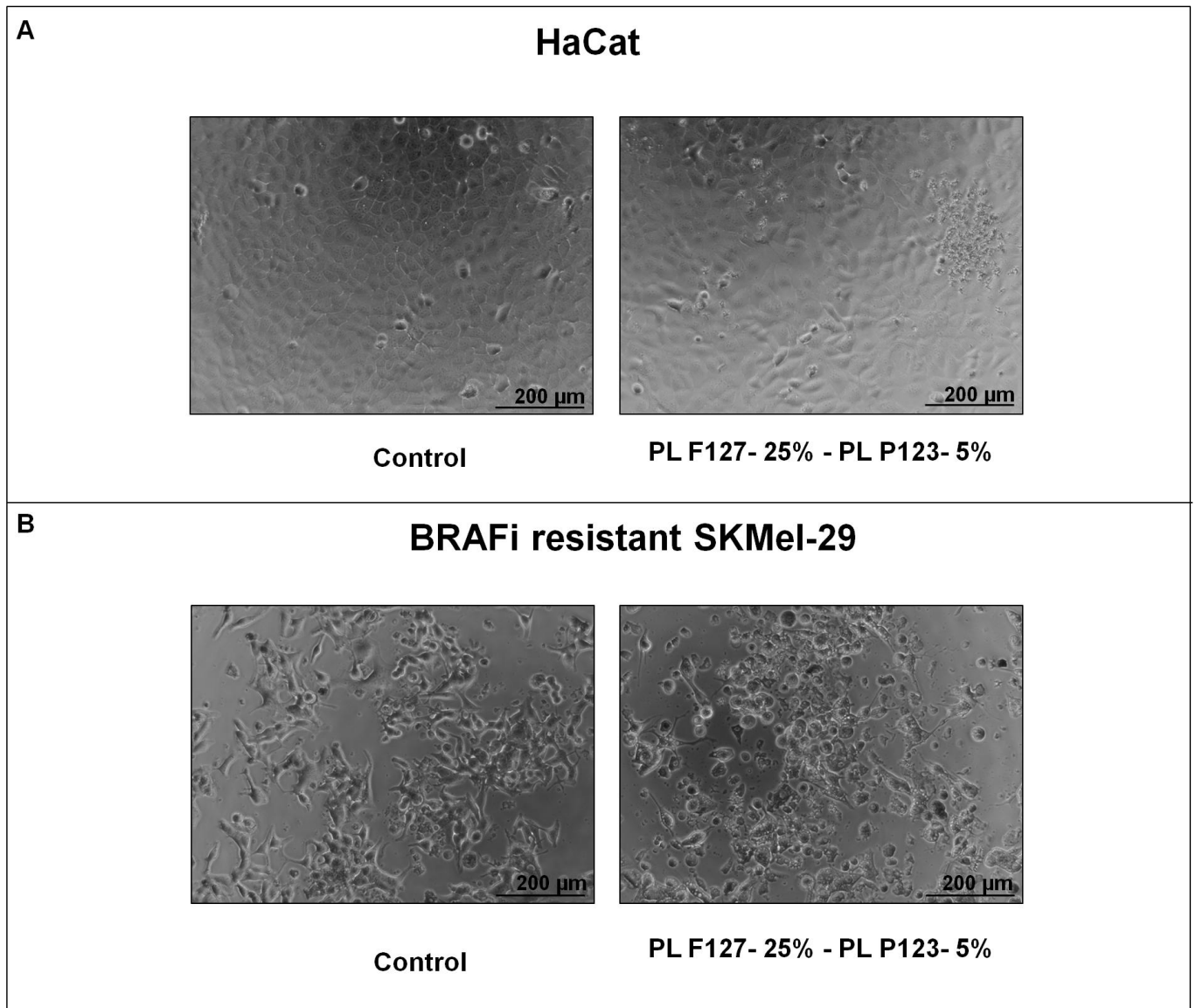


Figure 2: Pluronic binary system (PL F127- 25% - PL P123- 5%) provokes different effects in the morphology of normal human keratinocytes and melanoma. Cells were treated with 3% of binary system. Images were captured in the citation, after treatment for 24h.

BRAFi resistant SKMel-29

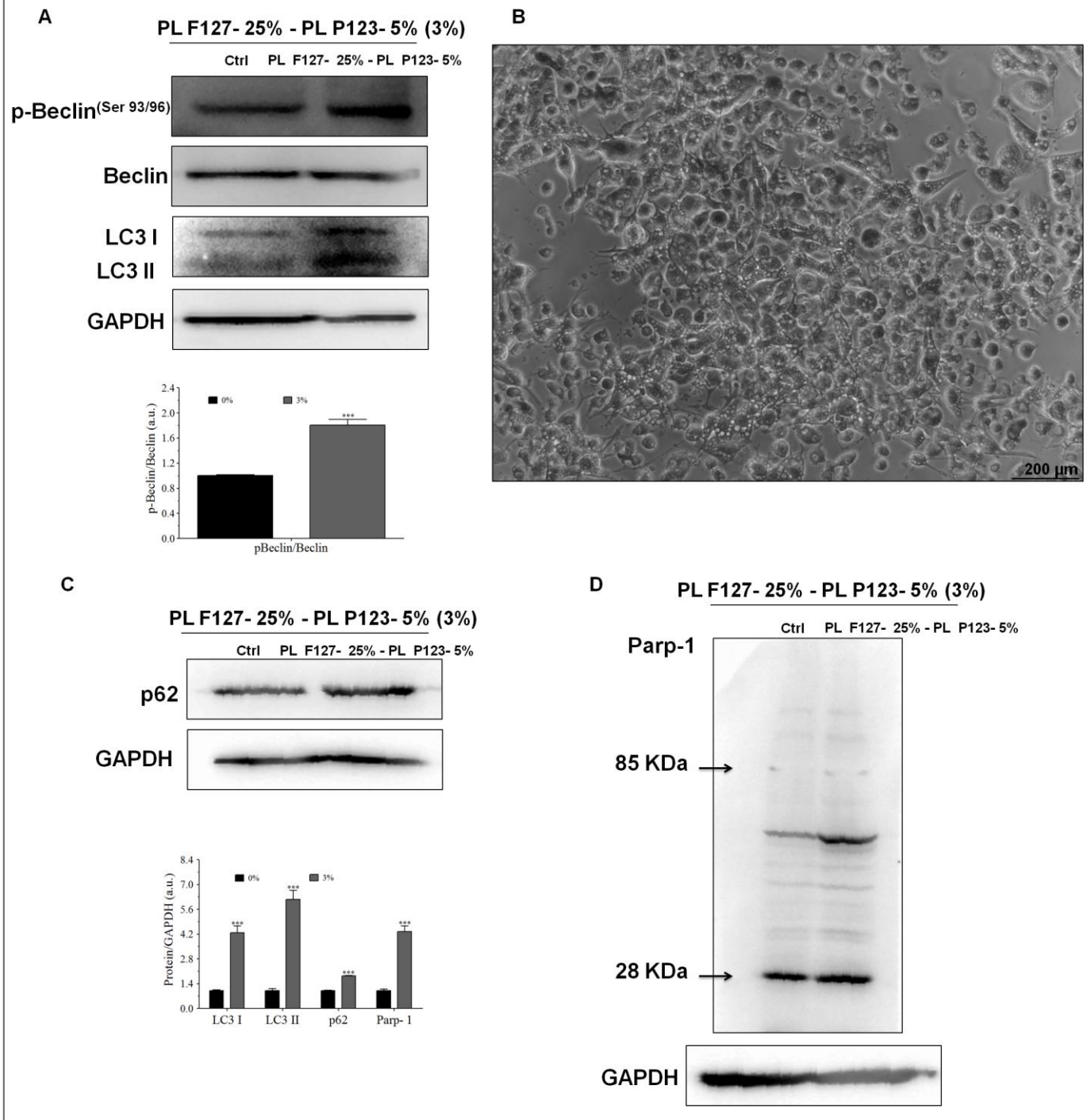


Figure 3: Autophagy and apoptosis molecular markers are modulated by Pluronic binary system (PL F127- 25% - PL P123- 5%). Cells were treated with 3% of Pluronic binary system for 24h, subsequently the medium was removed, the cells washed with saline and lysed with specific buffer. Afterwards the proteins were analyzed by western blotting and densitometry analysis were performed using GAPDH as loading control.

3.3. *Pluronics® PL F127-PL P123 hydrogel inhibits MAPK and AKT signaling pathway in BRAFi resistant melanoma*

Most patients with melanoma have either B-RAF or N-RAS mutations and these oncogenes lead to activation of AKT signaling pathway, keeping active the cell proliferation and survival pathways [17, 18]. Interestingly, BRAFi resistant SKMel-29 melanoma cells treated with Pluronics® hydrogel presented an inhibition of a key pathway responsible for this resistance, as it can be seen by a decrease in the ratio of phospho-Akt/Akt (Figure 4).

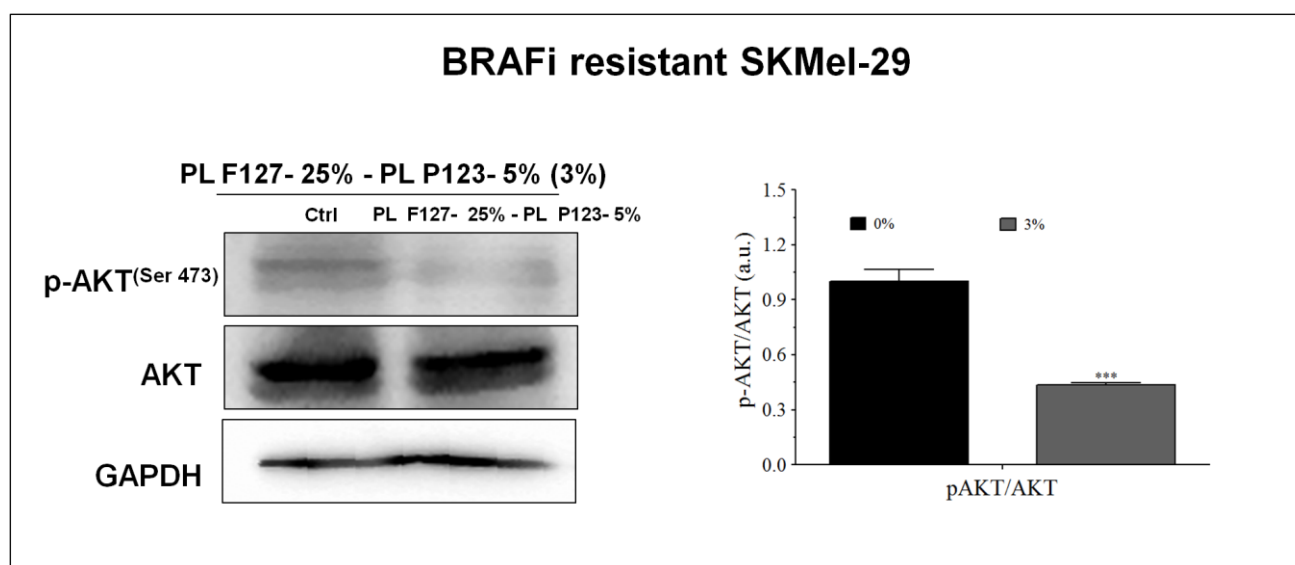
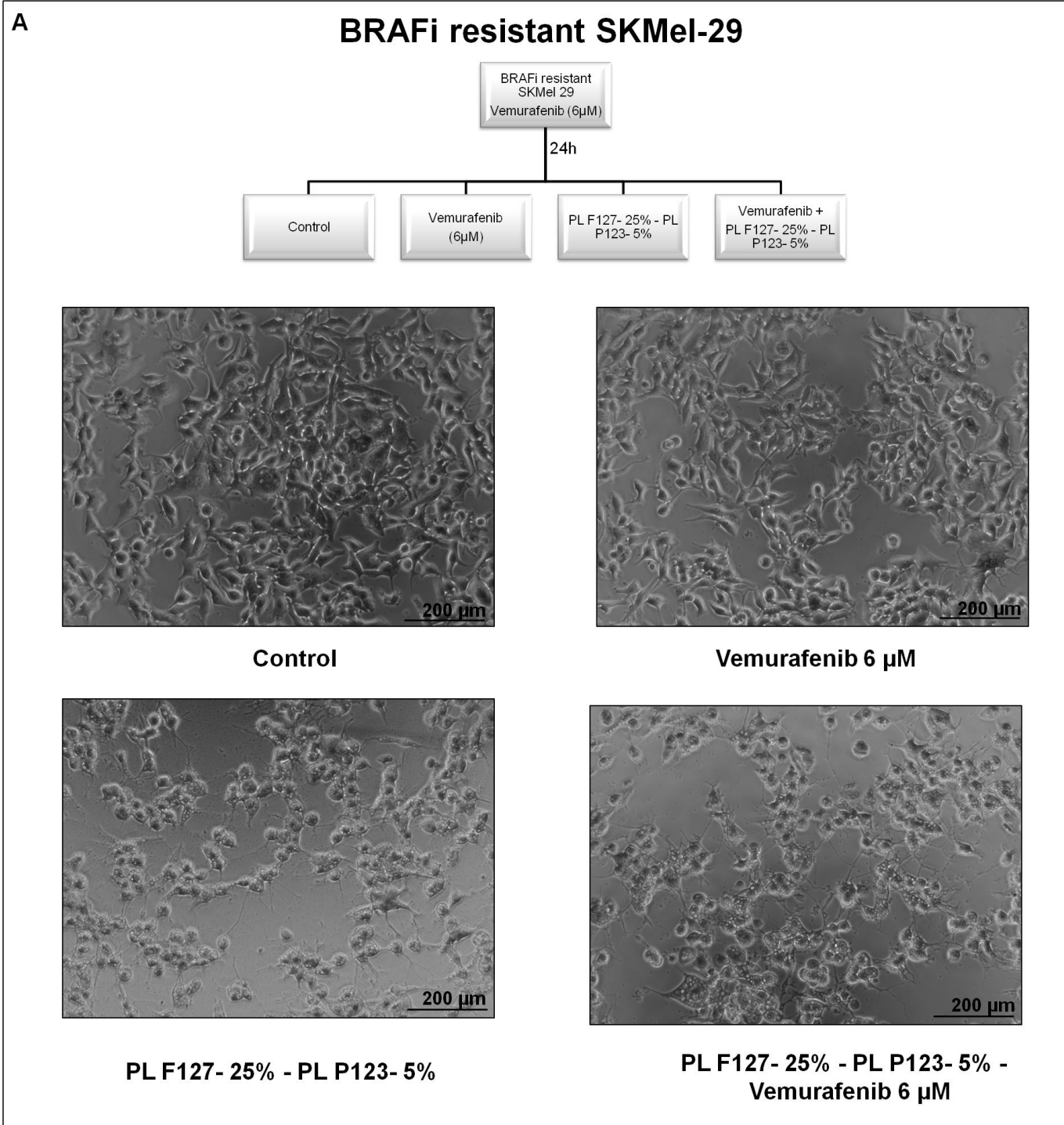


Figure 4: Pluronic binary system (PL F127- 25% - PL P123- 5%) downregulates protein kinases that gives survival advantage to vemurafenib resistant melanoma. Cells were treated with 3% of Pluronic binary system for 24h, subsequently the medium was removed, the cells washed with saline and lysed with specific buffer. Afterwards the proteins were analyzed by western blotting and densitometry analysis were performed using GAPDH as loading control.

3.4. *Pluronics® PL F127-PL P123 hydrogel sensitizes resistant melanoma cells to vemurafenib treatment*

Since melanoma cells treated with hydrogel had their survival capacity compromised, we examined if this treatment would improve the cell response towards vemurafenib. Therefore, the cells were treated with hydrogel or vemurafenib for 24h, or either treated firstly with vemurafenib followed with hydrogel or in the other way around, for more 24h. As it can be seen in the Figure 5, the biggest morphological alteration was observed when the cells were treated with hydrogel for 24h and

afterwards the culture medium was replaced by medium containing vemurafenib and let in for more 24h.



B

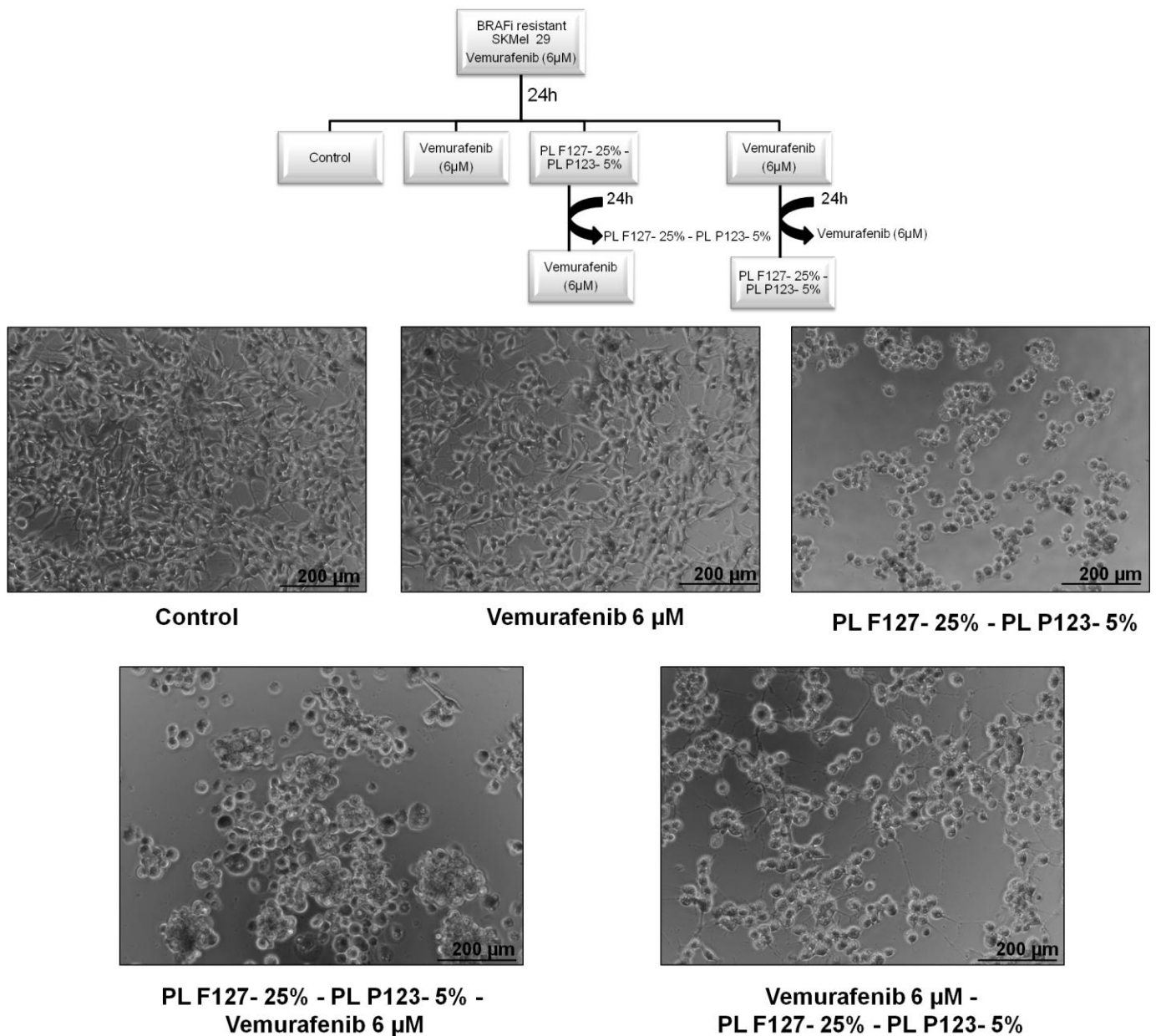
BRAFi resistant SKMel-29

Figure 5: Pluronic binary system (PL F127- 25% - PL P123- 5%) sensitizes melanoma cells to vemurafenib treatment. (A) Cells were plated and cultured in the presence of 6μM vemurafenib for 24h. Afterwards the medium was replaced by other containing 6μM vemurafenib, 3% Pluronic binary system (PL F127- 25% - PL P123 - 5%) or the combination of 3% Pluronic binary system (PL F127- 25% - PL P123 -5%) plus 6μM vemurafenib and let for 24h. Subsequently, the images were captured. (B) Cells were plated and cultured in the presence of 6μM vemurafenib for 24h. Afterwards the medium was removed and cells treated with 6μM vemurafenib or 3% Pluronic binary system (PLF127- 25% - PLP123- 5%). Twenty hours later both treatments were removed and vemurafenib and binary system (PL F127- 25% - PL P123- 5%) added as indicated.

4. Discussion

In malignant melanoma, activating missense mutations in the serine/threonine kinase *BRAF* gene are found in the majority of tumors [17]. Vemurafenib, a BRAF inhibitor, shows antiproliferative effects in malignant melanoma, but, unfortunately, resistance frequently develops already during the first year of treatment [19, 20]. Acquired resistance to BRAF inhibitor is characterized by a maximal response in the beginning of the treatment, followed by the appearance of a sub-population of BRAF-tolerant cells and subsequently, this new resistant population proliferates, leading to progressive disease [8, 21]. Based on this phenomenon, research has been focused on not only towards scrutinizing the complex mechanisms behind the acquired-resistance, but also to define novel ways to bypass and accentuate the therapeutic outcome. In addition to alterations in molecular mediators mentioned in the introduction section, autophagy was recently implicated in the BRAFi acquired-resistance [22, 23]. In the present study, we demonstrated that Pluronics® inhibit autophagy process in BRAFi resistant SKMel-29 melanoma cells.

Pluronics® are copolymers with different numbers of hydrophilic ethylene oxide and hydrophobic propylene oxide blocks which determine their hydrophilic-lipophilic balances (HLB). In this work, we have studied the biological properties of a PL-based binary system composed of PLF127 and PLP123 with HLB values of 22 and 8, respectively. This important feature confer to them the capability for forming thermosensitive self-assembled mixed micelles, since in aqueous solutions and above critical micelle concentration and temperature the propylene oxide units and ethylene oxide units are self-assembled for forming the micellar core and corona, respectively [12]. The hydrodynamic diameters of Pluronic® micelles usually vary between 10 nm to 100 nm [9] and at high temperatures (such as 37°C) present reduced dimensions compared to 25°C, for example, as observed by the results from Dynamic Light Scattering technique. Physico-chemical arrangements of PL-based micellar systems have been well studied in the literature looking forward a variety of technological and biomedical applications. However, the mechanisms related to biological properties inherent to those copolymers are still under investigation. During some years, it was believed that Pluronics® were biologically inert components that protect drugs from degradation, prolonging their exposure to tissues, and enhancing the drug transport into cells. However, the group of Kabanov and others reported that select synthetic polymers can alter specific cellular responses such as 1) altering membranes viscosity; 2) decreases the ATP levels in cancer cells; 3) inhibits P-glycoprotein, a drug efflux transporter; 4) induce release of cytochrome C and increase of reactive oxygen

species levels in the cytoplasm; 5) positively modulates pro-apoptotic signaling; 6) inhibit detoxification system; and 7) abolish drug sequestration within cytoplasmic vesicles (for a detailed review see) [10].

We now demonstrated another biological function of Pluronics[®], the inhibition of autophagy process in BRAFi resistant SKMel-29 melanoma cells. Our findings revealed that pluronic binary system (PL F127 - PL P123) blocked one of the last steps of autophagy, as proved by an increase of p62 protein level. Autophagy is stimulated in response to both physiological and pathological conditions such as starvation, hypoxia and low energy, and protein aggregates. Autophagy is a crucial adaptive response that initiates the sequestration of damaged or ageing intracellular content leading to its degradation. This is a well organized process that ensures important quality control of the cytoplasmic components along with the generation of building blocks to support cell proliferation and survival [24]. This multistep catabolic process has been shown to play an especially important role in melanoma acquisition of resistance to anti-cancer therapies [25]. Therefore, the aberrant control of autophagy has been considered among key hallmarks of cancer, including melanoma [26-28]. Indeed, there are some reports that highlighted the important of autophagy inhibition to by pass BRAFi resistance of melanoma. Wang and collaborators (2016) [29] reported that inhibition of autophagy by either a pharmacological inhibitor or interfering RNA knockdown of essential autophagy genes augmented vemurafenib-induced cell death. Ma and collaborators showed that targeting autophagy sensitized both BRAF inhibitor sensitive and resistant melanoma cells to vemurafenib [23]. Rebecca and co-workers (2014) reported that the inhibition of autophagy increases the antimelanoma action of AKT inhibitor in combination with paclitaxel and carboplatin [30]. Another interesting finding was the inhibition of AKT observed after treatment of melanoma cells (BRAFi resistant SKMel-29) with hydrogel (PL F127 - PL P123).

5. Conclusion

In conclusion, this study highlights the applicability of Pluronics[®] binary system PLF127/PLP123 as BRAFi resistant melanoma cells sensitizer agents to respond to vemurafenib death stimulus. Specifically, we observed that PLF127/PLP123 switches off AKT kinases and blocked autophagy. Since Pluronics[®] are employed as drug delivery systems, it may be a good strategy to develop a PLF127/PLP123 formulation for controlled release of vemurafenib. Therefore, Pluronics would have two functions a) to sensitize melanoma cells that are addicted to autophagy, by blocking this process; and b) to deliver vemurafenib.

6. Acknowledgements

The authors thank the São Paulo Research Foundation (Fapesp) for the M.P. Dias scholarship (2015/01138-1) and for the acquisition of Cytation 5™ Cell Imaging Multi-Mode Reader (multi-user equipment program grant #15/06134-4).

References

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal. Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 67 (1) (2017) 7-30.
- [2] J. Larkin, P.A. Ascierto, B. Dréno, V. Atkinson, G. Liskay, M. Maio, M. Mandalà, L. Demidov, D. Stroyakovskiy, L. Thomas, L. de la Cruz-Merino, C. Dutriaux, C. Garbe, M.A. Sovak, I. Chang, N. Choong, S.P. Hack, G.A. McArthur, A. Ribas. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 371 (20) (2014) 1867-1876.
- [3] G.V. Long, D. Stroyakovskiy, H. Gogas, E. Levchenko, F. de Braud, J. Larkin, C. Garbe, T. Jouary, A. Hauschild, J.J. Grob, V. Chiarion Sileni, C. Lebbe, M. Mandalà, M. Millward, A. Arance, I. Bondarenko, J.B.A.G. Haanen, J. Hansson, J. Utikal, V. Ferraresi, N. Kovalenko, P. Mohr, V. Probachai, D. Schadendorf, P. Nathan, C. Robert, A. Ribas, D.J. DeMarini, J.G. Irani, M. Casey, D. Ouellet, A.-M. Martin, N. Le, K. Patel, K. Flaherty. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 371 (20) (2014) 1877-1888.
- [4] J. Müller, O. Krijgsman, J. Tsoi, L. Robert, W. Hugo, C. Song, X. Kong, P.A. Possik, P.D.M. Cornelissen-Steijger, M.H.G. Foppen, K. Kemper, C.R. Goding, U. McDermott, C. Blank, J. Haanen, T.G. Graeber, A. Ribas, R.S. Lo, D.S. Peeper. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nature Communications*. 5 (2014) 5712.
- [5] C. Robert, B. Karaszewska, J. Schachter, P. Rutkowski, A. Mackiewicz, D. Stroiakovski, M. Lichinitser, R. Dummer, F. Grange, L. Mortier, V. Chiarion-Sileni, K. Drucis, I. Krajsova, A. Hauschild, P. Lorigan, P. Wolter, G.V. Long, K. Flaherty, P. Nathan, A. Ribas, A.-M. Martin, P. Sun, W. Crist, J. Legos, S.D. Rubin, S.M. Little, D. Schadendorf. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *New England Journal of Medicine*. 372 (1) (2014) 30-39.
- [6] F. Faiao-Flores, D.K. Alves-Fernandes, P.C. Pennacchi, S. Sandri, A.L.S.A. Vicente, C. Scapulatempo-Neto, V.L. Vazquez, R.M. Reis, J. Chauhan, C.R. Goding, K.S. Smalley, S.S. Maria-Engler. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene*. 36 (13) (2016) 1849-1861.
- [7] S. Sandri, F. Faiao-Flores, M. Tiago, P.C. Pennacchi, R.R. Massaro, D.K. Alves-Fernandes, G.N. Berardinelli, A.F. Evangelista, V. de Lima Vazquez, R.M. Reis, S.S. Maria-Engler. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacological Research*. 111 (2016) 523-533.
- [8] T. Amaral, T. Sinnberg, F. Meier, C. Krepler, M. Levesque, H. Niessner, C. Garbe. MAPK pathway in melanoma part II- secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer*. 73 (2017) 93-101.
- [9] A.V. Kabanov, I.R. Nazarova, I.V. Astafieva, E.V. Batrakova, V.Y. Alakhov, A.A. Yaroslavov, V.A. Kabanov. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent

- Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions. *Macromolecules*. 28 (7) (1995) 2303-2314.
- [10] E.V. Batrakova, A.V. Kabanov. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*. 130 (2) (2008) 98-106.
- [11] D.Y. Alakhova, A.V. Kabanov. Pluronic and MDR Reversal: An Update. *Molecular Pharmaceutics*. 11 (8) (2014) 2566-2578.
- [12] G. Dumortier, J.L. Grossiord, F. Agnely, J.C. Chaumeil. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research*. 23 (12) (2006) 2709-2728.
- [13] R. Nazarian, H. Shi, Q. Wang, X. Kong, R.C. Koya, H. Lee, Z. Chen, M.-K. Lee, N. Attar, H. Sazegar, T. Chodon, S.F. Nelson, G. McArthur, J.A. Sosman, A. Ribas, R.S. Lo. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 468 (7326) (2010) 973-977.
- [14] P.C. Pennacchi, M.E.S. de Almeida, O.L.A. Gomes, F. Faião-Flores, M.C. de Araújo Crepaldi, M.F. dos Santos, S.B. de Moraes Barros, S.S. Maria-Engler. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. *Tissue Engineering Part A*. 21 (17-18) (2015) 2417-2425.
- [15] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65 (1) (1983) 55-63.
- [16] T.E. Rusten, H. Stenmark. p62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol*. 12 (3) (2010) 207-209.
- [17] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W.C. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417 (6892) (2002) 949-954.
- [18] M. Kunz. Oncogenes in melanoma: An update. *European Journal of Cell Biology*. 93 (1-2) (2014) 1-10.
- [19] P.B. Chapman, A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S.J. O'Day, J.A. Sosman, J.M. Kirkwood, A.M.M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R.J. Lee, K.T. Flaherty, G.A. McArthur. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine*. 364 (26) (2011) 2507-2516.
- [20] D.B. Johnson, A.M. Menzies, L. Zimmer, Z. Eroglu, F. Ye, S. Zhao, H. Rizos, A. Sucker, R.A. Scolyer, R. Gutzmer, H. Gogas, R.F. Kefford, J.F. Thompson, J.C. Becker, C. Berking, F. Egberts, C. Loquai, S.M. Goldinger, G.M. Pupo, W. Hugo, X. Kong, L.A. Garraway, J.A. Sosman, A. Ribas, R.S. Lo, G.V. Long, D. Schadendorf. Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *European Journal of Cancer*. 51 (18) (2015) 2792-2799.
- [21] H. Shi, A. Hong, X. Kong, R.C. Koya, C. Song, G. Moriceau, W. Hugo, C.C. Yu, C. Ng, T. Chodon, R.A. Scolyer, R.F. Kefford, A. Ribas, G.V. Long, R.S. Lo. A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition. *Cancer discovery*. 4 (1) (2014) 69-79.
- [22] J.-H. Ahn, M. Lee. Autophagy-Dependent Survival of Mutant B-Raf Melanoma

- Cells Selected for Resistance to Apoptosis Induced by Inhibitors against Oncogenic B-Raf. *Biomolecules & Therapeutics*. 21 (2) (2013) 114-120.
- [23] X.-H. Ma, S.-F. Piao, S. Dey, Q. McAfee, G. Karakousis, J. Villanueva, L.S. Hart, S. Levi, J. Hu, G. Zhang, R. Lazova, V. Klump, J.M. Pawelek, X. Xu, W. Xu, L.M. Schuchter, M.A. Davies, M. Herlyn, J. Winkler, C. Koumenis, R.K. Amaravadi. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *The Journal of Clinical Investigation*. 124 (3) (2014) 1406-1417.
- [24] D.J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, M.J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo Arozena, H. Adachi, C.M. Adams, P.D. Adams, K. Adeli, P.J. Adhihetty, S.G. Adler, et.al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 12 (1) (2016) 1-222.
- [25] R.K. Amaravadi, C.B. Thompson. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*. 13 (24) (2007) 7271.
- [26] A. Checinska, M.S. Soengas. The gluttonous side of malignant melanoma: basic and clinical implications of macroautophagy. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 24 (6) (2011) 1116-1132.
- [27] J.L. Armstrong, M. Corazzari, S. Martin, V. Pagliarini, L. Falasca, D.S. Hill, N. Ellis, S. Al Sabah, C.P.F. Redfern, G.M. Fimia, M. Piacentini, P.E. Lovat. Oncogenic B-Raf Signaling in Melanoma Impairs the Therapeutic Advantage of Autophagy Inhibition. *Clinical Cancer Research*. 17 (8) (2011) 2216.
- [28] M. Corazzari, G.M. Fimia, P. Lovat, M. Piacentini. Why is autophagy important for melanoma? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Seminars in Cancer Biology*. 23 (5) (2013) 337-343.
- [29] W. Wang, H. Kang, Y. Zhao, I. Min, B. Wyrwas, M. Moore, L. Teng, R. Zarnegar, X. Jiang, T.J. Fahey. Targeting autophagy sensitizes BRAF-mutant thyroid cancer to vemurafenib. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. (2016) jc.2016-1999.
- [30] V.W. Rebecca, R.R. Massaro, I.V. Fedorenko, V.K. Sondak, A.R.A. Anderson, E. Kim, R.K. Amavaradi, S.S. Maria-Engler, J.L. Messina, G.T. Gibney, R.R. Kudchadkar, K.S.M. Smalley. Inhibition of autophagy enhances the effects of the AKT inhibitor MK-2206 when combined with paclitaxel and carboplatin in BRAF wild-type melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 27 (3) (2014) 465-478.

5. Conclusão

Os dados gerados com o desenvolvimento deste trabalho nos permitem concluir que:

Sob o aspecto de caracterização físico-química todas 4 formulações apresentaram características adequadas para serem utilizadas na administração tópica da riboflavina;

- 1) As quatro formulações a base de Pluronic[®] (F1, F2, F3 e F4) apresentaram alta eficiência de incorporação desta vitamina;
- 2) Diâmetro médio micelar inferior a 32nm;
- 3) Distribuição populacional das micelas bimodal, à 25°C, passou à uma distribuição unimodal a 32,5°C e com a incorporação da RF;
- 4) Análise calorimetria exploratória indica um aumento no ΔH , apontando que esteja ocorrendo uma interação da RF com a porção correspondente ao core micelar;
- 5) As formulações apresentaram temperatura de gelificação (Tgel) menor que 25°C;
- 6) Além disto, as formulações se comportam como gel verdadeiro quando submetidas a variação de temperatura e frequência.

Sob o ponto de vista de ação biológica como antimelanoma as formulações F1- RF e F2- RF apresentam maior potencial por induzir morte celular por apoptose, e por aparentemente, favorecer a ação da riboflavina sem comprometer a viabilidade dos queratinócitos humanos normais. Outro aspecto que merece destaque foi a capacidade das formulações em inibirem o fluxo autofágico, propriedade que tem sido vantajosa em alguns tipos de melanoma, pois acarretam na maior sensibilidade destas células frente a estímulo de indução da apoptose. F3, *per si*, apresentou um forte efeito tóxico para as linhagens tumorais, em especial para SKMel-29 PLX- R (linhagem resistente ao Vemurafenibe).

6. Referências Bibliográficas

- A. P. Albino, R. Le Strange, A. I. Oliff, M. E. Furth, L. J. Old. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature*. 1984. 308, 69–72.
- Abildgaard, C.; Guldberg, P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol. Med.* 2015. 21, 164–171.
- Adams, J.M.; Cory, S. Bcl-2 Regulated Apoptosis: Mechanism and Therapeutic Potential. *Curr. Opin. Immunol.* 2007, 19, 488–496.
- Aita, V.M.; Liang, X.H.; Murty, V.V.; et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*. 1999; 59(1), 59–65.
- Alakhov, V.; Klinski, E.; Li, S.; Pietrzynski, G.; Venne, A.; Batrakova, E.V.; Bronitch, T.; Kabanov, A.; Block copolymer-based formulation of Doxorubicin. From cell screen to clinical trials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1999. 16(1-4), 113–134.
- Alakhov, V.; Moskaleva, E.; Batrakova, E.; Kabanov, A. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconjug. Chem.* 1996. 7, 209–216.
- Alexandridis, P.; Hatton, T. Poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Coll Surf A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1995. 96, 1-46.
- Alexandridis, P.; Hatton, T.A. Poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modelling. *Colloids Surfaces*. 1995. 96(1/2), 1-46.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2017*. Atlanta: American Cancer Society; 2017.
- Artzner F.; Geiger, S.; Olivier, A.; Allais, C.; Finet, S.; Agnely, F. Interactions between Pluronic in aqueous solutions: micellization and gelation studied by differential scanning calorimetry, small angle X-ray scattering, and rheology. *Langmuir*. 2007. 23(9), 5085-5092.
- Artzner, F.; Geiger, S.; Olivier, A.; Allais, C.; Finet, S.; Agnely, F. Interactions between Pluronic in aqueous solutions: micellization and gelation studied by differential scanning calorimetry, small angle X-ray scattering, and rheology. *Langmuir*. 2007. 23, 5085-5092.
- Baenke, F.; Chaneton, B.; Smith, M.; Van Den Broek, N.; Hogan, K.; Tang, H.; Viros, A.; Martin, M.; Galbraith, L.; Girotti, M.R.; Dhomen, N.; Gottlieb, E.; Marais, R. Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Mol Oncol*. 2016. 10(1), 73–84.
- Bardeesy, N.; Kim, M.; Xu, J.; Kim, R.-S.; Shen, Q.; Bosenberg, M.W.; Wong, W.H.; Chin, L. Role of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in RAS-Driven Melanoma. *Mol. Cell. Biol.* 2005. 25, 4176–4188.
- Batrakova, E. V.; Kabanov, A. V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*. 2008. 130(2), 98-106.

- Batrakova, E.; Han, H.; Alakhov, V.; Miller, D.; Kabanov, A. Effects of pluronic block copolymers on drug absorption in Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* 1998. 15, 850–855.
- Batrakova, E.V.; Dorodnych, T.Y.; Klinskii, E.Y.; Kliushnenkova, E.N.; Shemchukova, O.B.; Goncharova, O.N.; Arjakov, S.A.; Alakhov, V.Y.; Kabanov, A.V. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *Br. J. Cancer.* 1996. 74, 1545–1552.
- Batrakova, E.V.; Li, S.; Li, Y.; Alakhov, V.Y.; Elmquist, W.F.; Kabanov, A.V. Distribution kinetics of a micelle-forming block copolymer pluronic P85. *J. Control. Release.* 2004. 100, 389–397.
- Bertoli, C.; Skotheim, J.M.; de Bruin, R.A.M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. 14(8), 518–528.
- Bjorkoy, G.; Lamark, T.; Brech, A.; Outzen, H.; Perander, M.; Overvatn, A.; Stenmark, H.; Johansen, T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 2005. 171, 603–614.
- Boehnke, C.; Reuter, U.; Flach, U.; Schuh-Hofer, S.; Einhäupl, K.M.; Arnold, G. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. *Eur J Neurol.* 2004. 11(7), 475–477.
- Bollag, G.; Hirth, P.; Tsai, J.; Zhang, J.; Ibrahim, P.N.; Cho, H.; et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in *BRAF*-mutant melanoma. *Nature.* 2010. 467, 596–599.
- Bollag, G.; Tsai, J.; Zhang, J.; Zhang, C.; Ibrahim, P.; Nolop, K.; Hirth, P. Vemurafenib: the first drug approved for *BRAF*-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012. 11(11), 873–86.
- Buzalaf, M. A. R.; Taga, E. M.; Granjeiro, J. M.; Ferreira C. V.; Lourenção, V. A.; Ortega, M. M.; Poletto, D. W.; Aoyama, H. Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase. *Exp. Lung Res.* 1998. 24(3), 269–272.
- Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with *BRAF* V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011. 364, 2507–16.
- Chaves Neto, A.H.; Pelizzaro-Rocha, K.J.; Fernandes, M.N.; Ferreira-Halder, C.V. Antitumor activity of irradiated riboflavin on human renal carcinoma cell line 786-O. *Tumour Biol.* 2015. 36(2), 595–604.
- Cohn, D.; Sosnik, A.; Levy, A. Improved reverse thermo-responsive polymeric systems. *Biomaterials.* 2003. 24(21), 3707–3714.
- Coleman, M.L.; Marshall, C.J. A family outing: small GTPases cyclin' through G1. *Nat Cell Biol.* 2001. 3:E250–E251.
- Croy, S.R.; Kwon, G.S. Polymeric micelles for drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* 2006. 12(36), 4669–4684.
- Croy, S.R.; Kwon, G.S. Polysorbate 80 and Cremophor EL micelles deaggregate and solubilize nystatin at the core-corona interface. *J. Pharm. Sci.* 2005. 94, 2345–2354.
- Croy, S.R.; Kwon, G.S. The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *J. Control. Release.* 2004. 95, 161–171.
- Curtin, J.A.; Busam, K.; Pinkel, D.; Bastian, B.C. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006. 24(26), 4340–4346.

- David, Holmes. The Cancer That Rises With The Sun. *Nature*. 2014. 515(7527):S110-1.
- Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B.A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G.J.; Bigner, D.D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J.W.; Leung, S.Y.; Yuen, S.T.; Weber, B.L.; Seigler, H.F.; Darrow, T.L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C.J.; Wooster, R.; Stratton, M.R.; Futreal, P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002. 417 (6892), 949–954.
- de Souza Queiroz, K.C.; Zambuzzi, W.F.; Santos de Souza, A.C.; da Silva, R.A.; Machado, D.; Justo, G.Z.; Carvalho, H.F.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira, C.V. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett*. 2007. 258(1), 126-134.
- de Souza, A.C.; Kodach, L.; Gadelha, F.R.; Bos, C.L.; Cavagis, A.D.; Aoyama, H.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira, C.V. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis*. 2006. 11(10),1761-1771.
- de Souza, A.C.; Kodach, L.; Gadelha, F.R.; Bos, C.L.; Cavagis, A.D.; Aoyama, H.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira, C.V. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis*. 2006. 11(10), 1761-1771.
- defined cytoplasmic organelles. *Science*. 2003. 300, 615–618.
- Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Zuber, M.; Couarraze, G.; Chaumeil, J.C. Thermoreversible morphine gel. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 1991. 17(9),1255-1265.
- Edwards, A. M.; Bueno, C.; Saldaña, A.; Silva, E.; Kassab, K.; Polo, L.; Jori, G.; J. Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins. *J. Photochem. Photobiol. B*. 1999. 48(1), 36-41.
- Edwards, A.M.; Barredo, F.; Silva, E.; De Ioannes, A.E.; Becker, M.I. Apoptosis induction in nonirradiated human HL-60 and murine NSO/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin. *Photochem Photobiol*. 1999. 70(4):645-649.
- Emmons, M.F.; Faião-Flores, F.; Smalley, K.S. The role of phenotypic plasticity in the escape of cancer cells from targeted therapy. *Biochem Pharmacol*. 2016. 15(122), 1-9.
- Escorcia, F.E.; McDevitt, M.R.; Villa, C.H.; Scheinberg, D.A. Targeted nanomaterials for radiotherapy. *Nanomedicine*. 2007. 2, 805–815.
- Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- Falletta, P.; Sanchez-Del-Campo, L.; Chauhan, J.; Efferm, M.; Kenyon, A.; Kershaw, C.J.; Siddaway, R.; Lisle, R.; Freter, R.; Daniels, M.J.; Lu, X.; Tüting, T.; Middleton, M.; Buffa, F.M.; Willis, A.E.; Pavitt, G.; Ronai, Z.A.; Sauka-Spengler, T.; Hölzel, M.; Goding, C.R. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev*. 2017. 31(1), 18-33.
- Felicetti, F.; Parolini, I.; Bottero, L.; et al. Caveolin-1 tumor promoting role in human melanoma. *Int J Cancer*. 2009. 125, 1514–1522.
- Flaherty, K.T.; Puzanov, I.; Kim, K.B.; Ribas, A.; McArthur, G.A.; Sosman, J.A.; O'Dwyer, P.J.; Lee, R.J.; Grippo, J.F.; Nolop, K.; Chapman, P.B. Inhibition

- of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010. 363(9), 809-819.
- França, D.S.; Souza, A.L.; Almeida, K.R.; Dolabella, S.S.; Martinelli, C.; Coelho, M.M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur J Pharmacol*. 2001. 421(3), 157-164.
- Freitas, M.N.; Farah, M.; Bretas, R.E.S.; Ricci-Júnior, E.; Marchetti, J.M. Rheological characterization of Pluronic 407 nimesulide gels. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2006. 27(2), 113-118.
- Furge, K.A.; Kiewlich, D.; Le, P.; Nga Vo, M.; Faure, M.; Howlett, A.R.; Lipson, E.L.; Vande Woude, G.F.; Webb, C.P. Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *PNAS*. 2001. 98(19), 10722–10727.
- Granados-Soto, V.; Terán-Rosales, F.; Rocha-González, H.I.; Reyes-García, G.; Medina-Santillán, R.; Rodríguez-Silverio, J.; Flores-Murrieta, F.J. Riboflavin reduces hyperalgesia and inflammation but not tactile allodynia in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2004. 492(1), 35-40.
- Gu, S.; Fan, Z.; Wang, L.; Tao, X.; Zhang, Y.; Mu, G. Corneal collagen cross-linking with hypotonic riboflavin solution in keratoconic corneas. *Biomed Res Int*. 2014. 2014:754182.
- Hall, J.B.; Dobrovolskaia, M.A.; Patri, A.K.; McNeil, S.E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine*. 2007. 2, 789–803.
- He, C.; Levine, B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*. 2010. 22, 140–149.
- Hernandez-Davies, J.E.; Tran, T.Q.; Reid, M.A.; Rosales, K.R.; Lowman, X.H.; Pan, M.; Moriceau, G.; Yang, Y.; Wu, J.; Lo, R.S.; Kong, M. Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence. *J. Transl. Med*. 2015. 13, 210.
- Holmes, D. The Cancer That Rises With The Sun. S110. *Nature*. 2014 Vol. 5 – 15.
- Juhasz, J.; Lenaerts, V.; Raymond, P.; Ong, H. Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible Pluronic gels. *Biomaterials*. 1989. 10(4), 265-268.
- Kabanov, A.; Alakhov, V. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carr. Syst*. 2002. 19, 1–72.
- Kabanov, A.; Nazarova, I.; Astafieva, I.; Batrakova, E.; Alakhov, V.; Yaroslavov, A.; Kabanov, V. Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-b-oxypropylene- b-oxyethylene) solutions. *Macromolecules*. 1995. 28, 2303–2314.
- Kabanov, A.V. ; Vinogradov, S.V.; Suzdaltseva, Y.G.; Alakhov, V. Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery, *Bioconjug. Chem*. 1995. 6, 639–643.
- Kabanov, A.V.; Batrakova, E.V. New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des*. 2004. 10, 1355–1363.
- Kabanov, A.V.; Batrakova, E.V.; Miller, D.W. Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2003. 55, 151–164.
- Kabanov, A.V.; Chekhonin, V.P.; Alakhov, V.Y.; Batrakova, E.V.; Lebedev, A.S.; Melik-Nubarov, N.S.; Arzhakov, S.A.; Levashov, A.V.; Morozov, G.V.; Severin, E.S.; Kabanov, V.A. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. Micelles as microcontainers for drug targeting. *FEBS Lett*. 1989. 258, 343–345.

- Kato, J.Y.; Sherr, C.J. Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90, 11513–11517.
- Klionsky, D.J.; Abdalla, F.C.; Abeliovich, H.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012. 8(4), 445–544.
- Kodama, K.; Suzuki, M.; Toyosawa, T.; Araki, S. Inhibitory mechanisms of highly purified vitamin B2 on the productions of proinflammatory cytokine and NO in endotoxin-induced shock in mice. *Life Sci*. 2005. 78(2), 134–139.
- Kozlov, M.; Melik-Nubarov, N.; Batrakova, E.; Kabanov, A. Relationship between pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solutes. *Macromolecules*. 2000. 33, 3305–3313.
- Krupka, T.M.; Weinberg, B.D.; Wu, H.; Ziats, N.P.; Exner, A.A. Effect of intratumoral injection of carboplatin combined with pluronic P85 or L61 on experimental colorectal carcinoma in rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2007. 232, 950–957.
- Kwon, G.S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2003. 20(5), 357–403.
- Kwon, S.H.; Kim, S.Y.; Ha, K.W.; Kang, M.J.; Huh, J.S.; Im, T.J.; Kim, Y.M.; Park, Y.M.; Kang, K.H.; Lee, S.; Chang, J.Y.; Lee, J.; Choi, Y.W. Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery. *Arch. Pharm. Res*. 2007. 30, 1138–1143.
- Lee, E.W.; Lee, M.S.; Camus, S.; Ghim, J.; Yang, M.R.; Oh, W. et. al. Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO J*. 2009. 28(14), 2100–2113.
- Lee, J.; Giordano, S.; Zhang, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*. 2012. 441, 523–540.
- Lenaerts, V.; Triqueneaux, C.; Quarton, M.; Rieg-Falson, F.; Couvreur, P. Temperature-dependant rheological behavior of Pluronic F-127 aqueous solutions. *Int. J. Pharm.* 1987. 39, 121–127.
- Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008.
- Liang, X.H.; Jackson, S.; Seaman, M.; et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999. 402(6762), 672–676.
- Liu, J.; Fukunaga-Kalabis, M.; Li, L.; Herlyn, M. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch. Biochem. Biophys*. 2014. 563, 13–21.
- Liu, T.; Chu, B. Formation of homogeneous gel-like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solution: FCC to BCC phase transition. *J. Appl. Cryst*. 2000. 33, 727–730.
- Lopes, C. M.; Lobo, J. M. S.; Costa, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005. 41(2), 143–154.
- M. Borkovec. Measuring particle size by light scattering, in: K. Holmberg (Ed.), *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. 2002. 357–370.
- Ma, J.; Guo, C.; Tang, Y.; Xiang, J.; Chen, S.; Wang, J.; Liu H. Micellization in aqueous solution of an ethylene oxide-propylene oxide triblock copolymer, investigated with ¹H NMR spectroscopy, pulsed-field gradient NMR, and NMR relaxation. *J Colloid Interface Sci*. 2007. 312, 390–396.
- Machado, D.; Shishido, S.M.; Queiroz, K.C.; Oliveira, D.N.; Faria, A.L.; Catharino, R.R.; Spek, C.A.; Ferreira, C.V. Irradiated riboflavin diminishes the aggressiveness of melanoma in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013. 8(1):e54269.

- Mack, M.; Grill, S. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006. 71, 265–275.
- Maertens, O.; Johnson, B.; Hollstein, P.; Frederick, D.T.; Cooper, Z.A.; Messiaen, L.; Bronson, R.T.; McMahon, M.; Granter, S.; Flaherty, K.; Wargo, J.A.; Marais, R.; Cichowski, K. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov.* 2013. 3(3), 338-349.
- Merrill, A. H.; Lambeth, J. D. ; Edmondson, D. E. ; McCornick, D. B. Formation and mode of action of flavoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* 1981. 1, 281-317.
- micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 1998. 15, 1525–1532.
- Miller, A.J.; Mihm, M.C. Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006. 355(1):51- 65.
- Miller, S. C. ; Drabik, B. R.. Rheological properties of Pluronic vehicles. *Int. J. Pharm.* 1984. 18, 269-276.
- Missirlis, D.; Tirelli, N.; Hubbell, J.A. Amphiphilic hydrogel nanoparticles. Preparation, characterization, and preliminary assessment as new colloidal drug carriers. *Langmuir.* 2005. 21, 2605–2613.
- Mizushima, N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev.* 2007; 21(22), 2861-2873.
- Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010. 140(3), 313–326.
- Montagut, C.; Sharma, S.V.; Shioda, T.; McDermott, U.; Ulman, M.; Ulkus, L.E.; Dias-Santagata, D.; Stubbs, H.; Lee, D.Y.; Singh, A.; Drew, L.; Habet, D.A.; Settleman, J. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* 2008. 68(12): 4853-4861.
- Mora-Huertas, C.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics.* 2010. 385(1), 113-142.
- multiple liver tumors. *Genes Dev.* 2011. 25(8), 795–800.
- Muñoz, M.A.; Pacheco, A.; Becker, M.I.; Silva, E.; Ebensperger, R.; Garcia, A.M.; De Ioannes, A.E.; Edwards, A.M. Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation. *J Photochem Photobiol B.* 2011. 103(1), 57-67.
- Musgrove, E.A.; Caldon, C.E.; Barraclough, J.; Stone, A.; Sutherland, R.L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011. 11:558–572.
- Nayak, S.; Lyon, L.A. Soft nanotechnology with soft nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005. 44(47), 7686-7708.
- Nazarian, R.; Shi, H.; Wang, Q.; Kong, X.; Koya, R.C.; Lee, H.; et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010. 468, 973–977.
- Nicoleti, J. F.; Telis, V. R. N. Reologia de suspensões de colágeno na presença de maltodextrina e lactose. *Brazilian Journal of Food Technology.* 2009. VII BMCFB.
- Paluncic, J.; Kovacevic, Z.; Jansson, P.J.; Kalinowski, D.; Merlot, A.M.; Huang, M. L.-H.; Hiu Chuen, L.; Sumit, S.; Darius, J.R.L.; Des R. Richardson. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016. 1863(4), 770–784.
- Piliang, M.P. Acral lentiginous melanoma. *Clin Lab Med.* 2011. 31 (2), 281–8.
- Poulikakos, P.I.; Persaud, Y.; Janakiraman, M.; Kong, X.; Ng, C.; Moriceau, G.; et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature.* 2011. 480, 387–390.
- Powers, H.J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003. 77(6), 1352–1360.

- Qu, X.; Yu, J.; Bhagat, G.; Furuya, N.; Hibshoosh, H.; Troxel, A.; Rosen, J.; Eskelinen, E.L.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; Cattoretti, G.; Levine, B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003. 12(12), 1809-1820.
- Raiskup, F.; Spoerl, E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf.* 2013. 11(2), 65-74.
- Ratnikov, B.I.; Scott, D.A.; Osterman, A.L.; Smith, J.W.; Ronai, Z.A. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene.* 2017. 36(2), 147-157.
- Salem, A.K.; Searson, P.C.; Leong, K.W. Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nat. Mater.* 2003. 2, 668-671.
- Sándor, P.S.; Afra, J.; Ambrosini, A.; Schoenen, J. Prophylactic treatment of migraine with beta-blockers and riboflavin: differential effects on the intensity dependence of auditory evoked cortical potentials. *Headache.* 2000. 40(1), 30-35.
- Sandri, S.; Faião-Flores, F.; Tiago, M.; Pennacchi, P.C.; Massaro, R.R.; Alves-Fernandes, D.K.; Berardinelli, G.N.; Evangelista, A.F.; de Lima Vazquez, V.; Reis R.M.; Maria-Engler, S.S. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacol Res.* 2016. 111, 523-33.
- Saski, W.; Shah, S.G. Availability of drugs in the presence of surface-active agents. II. Effects of some oxyethylene oxypropylene polymers on the biological activity of hexetidine. *J. Pharm. Sci.* 1965. 54, 277-280.
- Saski, W.; Shah, S.G. Availability of drugs in the presence of surface-active agents. I. Critical micelle concentrations of some oxyethylene oxypropylene polymers. *J. Pharm. Sci.* 1965. 54, 71-74.
- Savic, R.; Luo, L.; Eisenberg, A.; Maysinger, D. Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science.* 2003. 25,300(5619), 615-618.
- Schmolka, I. R. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of biomedical materials research.* 1972. 6(6), 571-582.
- Schoenen, J.; Jacquy, J.; Lenaerts, M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial. *Neurology.* 1998. 50(2), 466-470.
- Shiroto, T.; Romero, N.; Sugiyama, T.; Sartoretto, J.L.; Kalwa, H.; Yan, Z.; Shimokawa, H.; Michel, T. Caveolin-1 is critical determinant of autophagy, metabolic switching, and oxidative stress in vascularendothelium. *PLoS One.* 2014. 3;9(2):e87871.
- Solit, D.B.; Garraway, L.A.; Pratilas, C.A.; Sawai, A.; Getz, G.; Basso, A.; Ye, Q.; Lobo, J.M.; She, Y.; Osman, I.; Golub, T.R.; Sebolt-Leopold, J.; Sellers, W.R.; Rosen, N. *BRAF* mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature.* 2006. 439(7074), 358-362.
- Sosman, J.A.; Kim, K.B.; Schuchter, L.; Gonzalez, R.; Pavlick, A.C.; Weber, J.S.; et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 2012. 366, 707-14.
- Spitzenberger, T.J.; Heilman, D.; Diekmann, C.; Batrakova, E.V.; Kabanov, A.V.; Gendelman, H.E.; Elmquist, W.F.; Persidsky, Y. Novel delivery system enhances efficacy of antiretroviral therapy in animal model for HIV-1 encephalitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007. 27, 1033-1042.
- Stahl, J.M.; Sharma, A.; Cheung, M.; Zimmerman, M.; Cheng, J.Q.; Bosenberg, M.W.; Kester, M.; Sandirasegarane, L.; Robertson, G.P. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004. 64(19), 7002-7010.

- Stark, M.; Hayward, N. Genome-Wide Loss of Heterozygosity and Copy Number Analysis in Melanoma Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Arrays. *Cancer Res.* 2007. 67, 2632–2642.
- Suri, S.S.; Fenniri, H.; Singh, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2007. 2, 16.
- Takamura, A.; Komatsu, M.; Hara, T.; Sakamoto, A.; Kishi, C.; Waguri, S.; Eishi, Y.; Hino, O.; Tanaka, K.; Mizushima, N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 2011, 25(8), 795-800.
- Tas, F.; Karabulut, S.; Tilgen Yasasever, C.; Duranyildiz, D. Clinical significance of serum caveolin-1 levels in melanoma patients. *Int J Dermatol.* 2016. 55(5), 558-562.
- Torchilin, V.P.; Lukyanov, A.N.; Gao, Z.; Papahadjopoulos-Sternberg, B. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(10), 6039- 6044.
- Toyosawa, T.; Suzuki, M.; Kodama, K.; Araki, S. Effects of intravenous infusion of highly purified vitamin B2 on lipopolysaccharide-induced shock and bacterial infection in mice. *Eur J Pharmacol.* 2004b. 492(2-3), 273-280.
- Toyosawa, T.; Suzuki, M.; Kodama, K.; Araki, S. Highly purified vitamin B2 presents a promising therapeutic strategy for sepsis and septic shock. *Infect Immun.* 2004 72(3), 1820-1823.
- Trentin, D.; Hubbell, J.; Hall, H. Non-viral gene delivery for local and controlled DNA release, *J. Control. Release.* 2005. 102, 263–275.
- Tsai, J.; Lee, J.T.; Wang, W.; Zhang, J.; Cho, H.; Mamo, S.; Bremer, R.; Gillette, S.; Kong, J.; Haass, N.K.; Sproesser, K.; Li, L.; Smalley, K.S.; Fong, D.; Zhu, Y.L.; Marimuthu, A.; Nguyen, H.; Lam, B.; Liu, J.; Cheung, I.; Rice, J.; Suzuki, Y.; Luu, C.; Settachatgul, C.; Shellooe, R.; Cantwell, J.; Kim, S.H.; Schlessinger, J.; Zhang, K.Y.; West, B.L.; Powell, B.; Habets, G.; Zhang, C.; Ibrahim, P.N.; Hirth, P.; Artis, D.R.; Herlyn, M.; Bollag, G. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic BRAf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008. 105(8), 3041- 3046.
- Valle, J.W.; Lawrance, J.; Brewer, J.; Clayton, A.; Corrie, P.; Alakhov, V.; Ranson, M. A phase II, window study of SP1049C as first-line therapy in inoperable metastatic adenocarcinoma of the oesophagus. *J. Clin. Oncol.* 2004. 22, 4195.
- Venne, A.; Li, S.; Mandeville, R.; Kabanov, A.; Alakhov, V. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res.* 1996. 56, 3626–3629.
- Verdrengh, M.; Tarkowski, A. Riboflavin in innate and acquired immune responses. *Inflamm Res.* 2005. 54(9), 390-393.
- Villanueva, J.; Vultur, A.; Lee, J.T.; Somasundaram, R.; Fukunaga-Kalabis, M.; Cipolla, A.K.; et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell.* 2010. 18, 683–695.
- Wang, Y.; Fisher, J.C.; Mathew, R.; Ou, L.; Otieno, S.; Sublet, J. et al., Intrinsic disorder mediates the diverse regulatory functions of the Cdk inhibitor p21, *Nat. Chem. Biol.* 2011. 7(4), 214–221.
- Welsh, S.J.; Rizos, H.; Scolyer, R.A.; Long, G.V. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *Eur J Cancer.* 2016. 24(62), 76-85.

- Wu, K.N.; Queenan, M.; Brody, J.R.; et al. Loss of stromal caveolin-1 expression in malignant melanoma metastases predicts poor survival. *Cell Cycle*. 2011. 10, 4250–4255.
- Wu, S.; Cetinkaya, C.; Munoz-Alonso, M.J.; Von Der Lehr, N.; Bahram, F.; Beuger, V.; et al., Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter, *Oncogene*. 2003. 22(3), 351–360.
- Yagi, A.; Hasegawa, Y.; Xiao, H.; Haneda, M.; Kojima, E.; Nishikimi, A. et al. GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription, *J. Cell.Biochem*. 2003. 90(6), 1242–1249.
- Yariv, D.; Efrat, R.; Libster, D.; Aserin, A.; Garti, N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010. 78(2), 185-92.
- Zaldua, N.; Llaveró, F.; Artaso, A.; Gálvez, P. Rac1/p21-activated kinase pathway controls retinoblastoma protein phosphorylation and E2F transcription factor activation in B lymphocytes, *FEBS J*. 2016. 283(4), 647–661.
- Zhang, Y.; Lam, Y.M.; Tan, W.S. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)-g-poly(vinylpyrrolidone): association behavior in aqueous solution and interaction with anionic surfactants. *J. Coll. Int. Sci*. 2005. 285, 74-79.

Anexos

Anexo I – Distribuição do diâmetro médio micelar por espalhamento de luz das formulações a base de Pluronic.

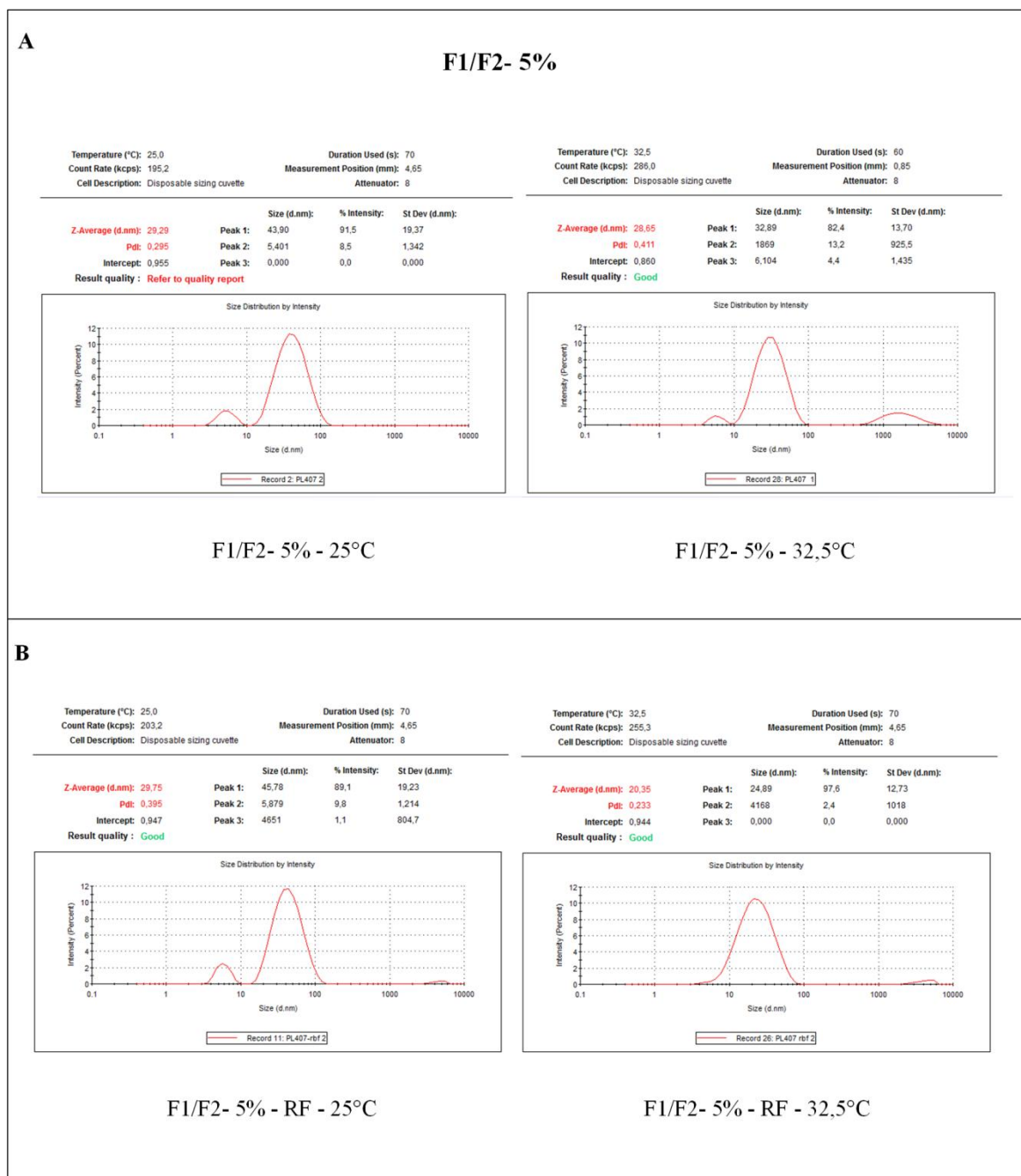


Figura 1: Distribuição do diâmetro médio micelar para o sistema isolado F1/F2-5%. (A) Experimento realizado a 25°C e 32,5°C e (B) após incorporação de RF a 25°C e 32,5°C. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

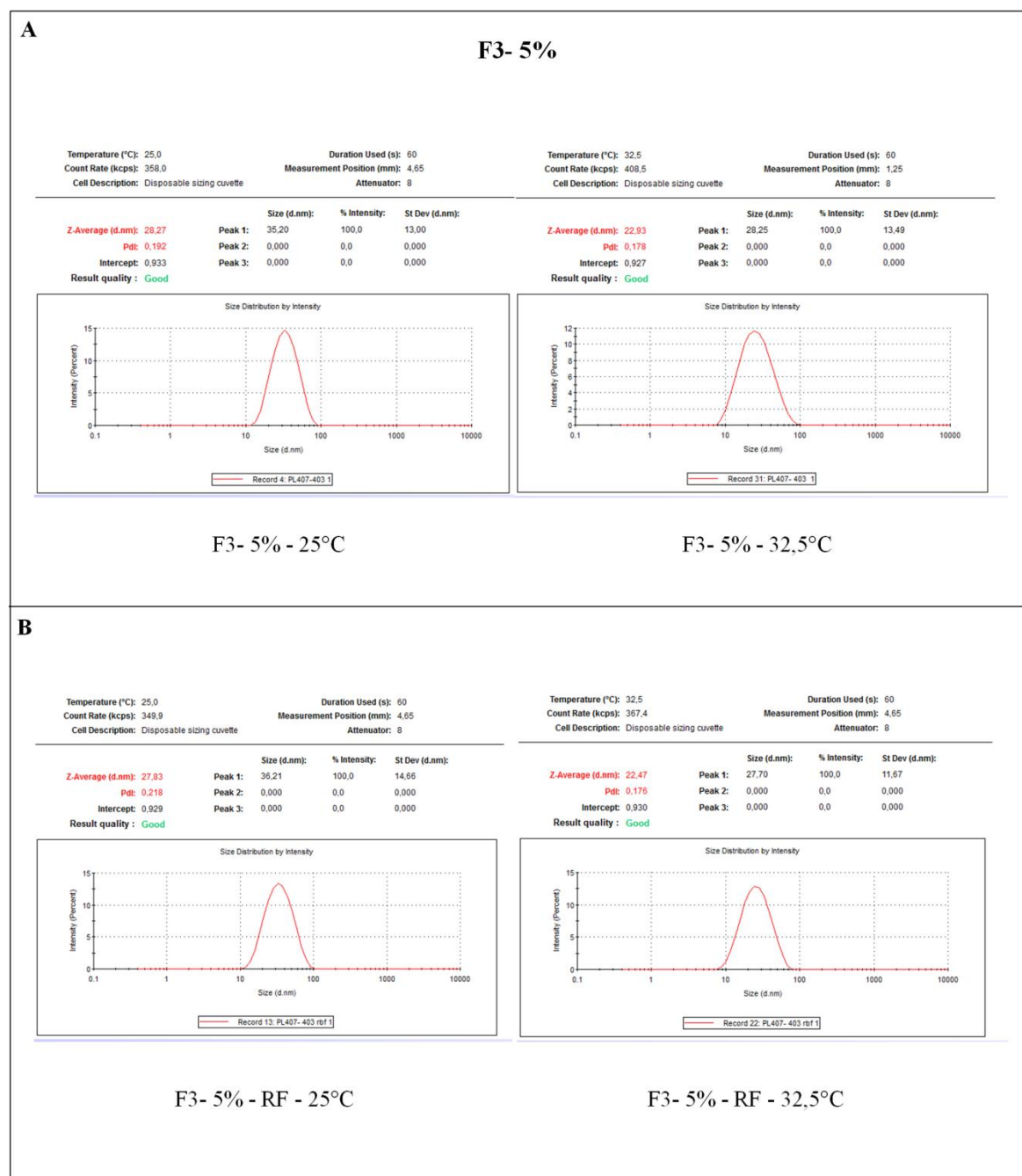


Figura 2: Distribuição do diâmetro médio micelar para o sistema binário F3- 5%.
 (A) Experimento realizado a 25°C e 32,5°C e (B) após incorporação de RF a 25°C e 32,5°C. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

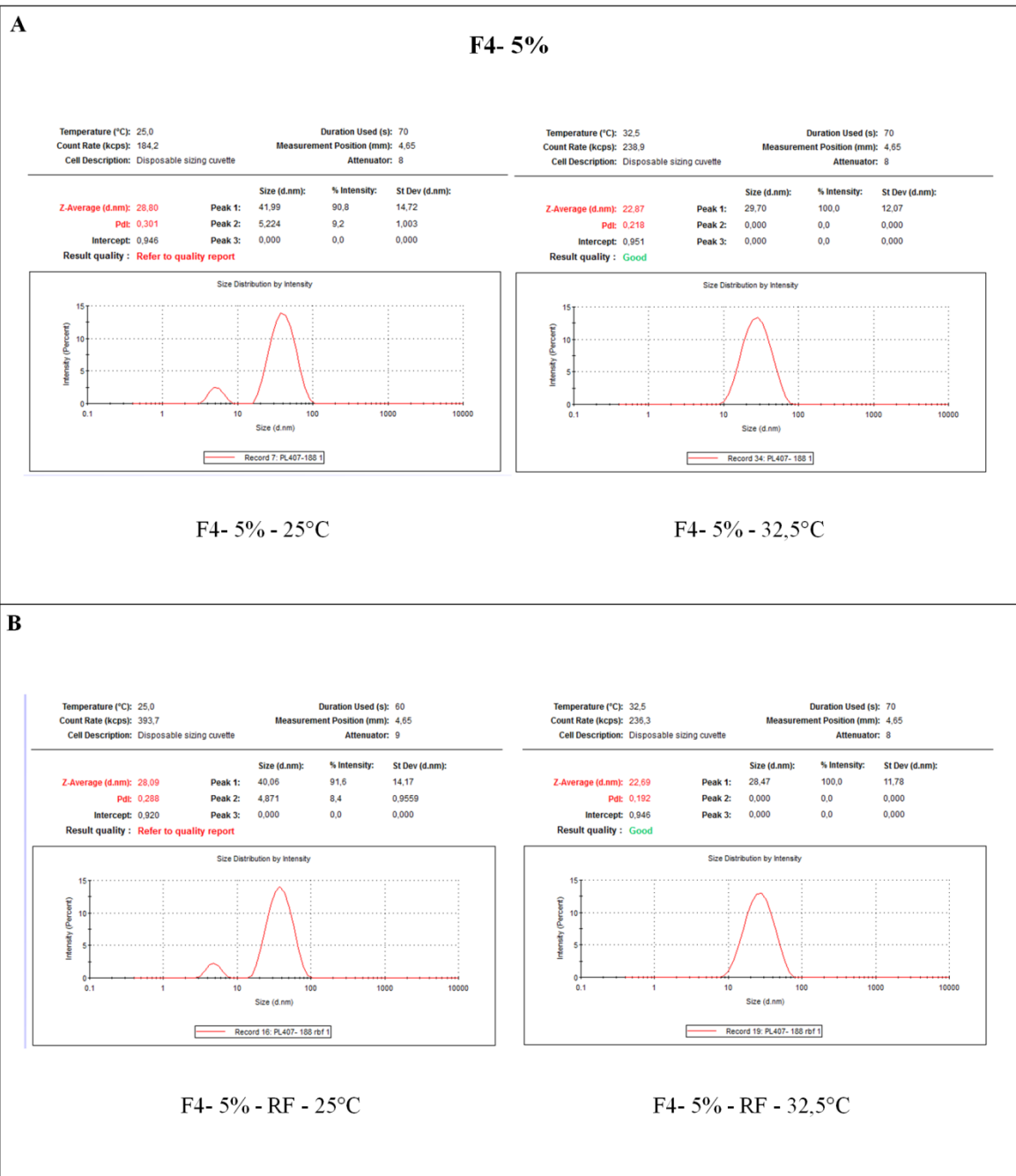


Figura 3: Distribuição do diâmetro médio micelar para o sistema binário F4- 5%. (A) Experimento realizado a 25°C e 32,5°C e (B) após incorporação de RF a 25°C e 32,5°C. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

Formulações Irradiadas

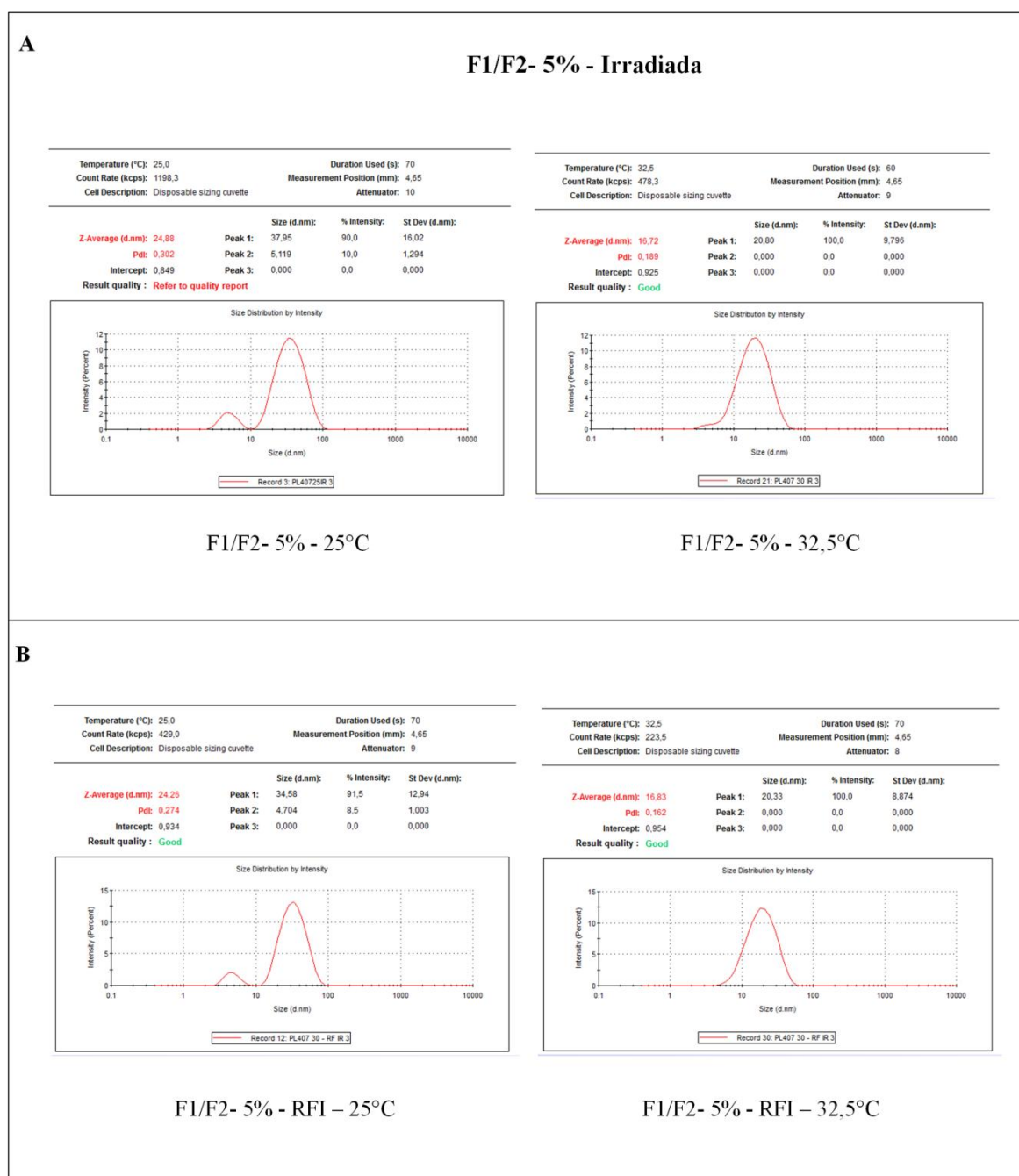


Figura 4: Distribuição do diâmetro médio micelar para o sistema isolado F1/F2-5%, após Irradiação com luz UV por 30 min. (A) Experimento realizado a 25°C e 32,5°C e (B) após incorporação de RF a 25°C e 32,5°C. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

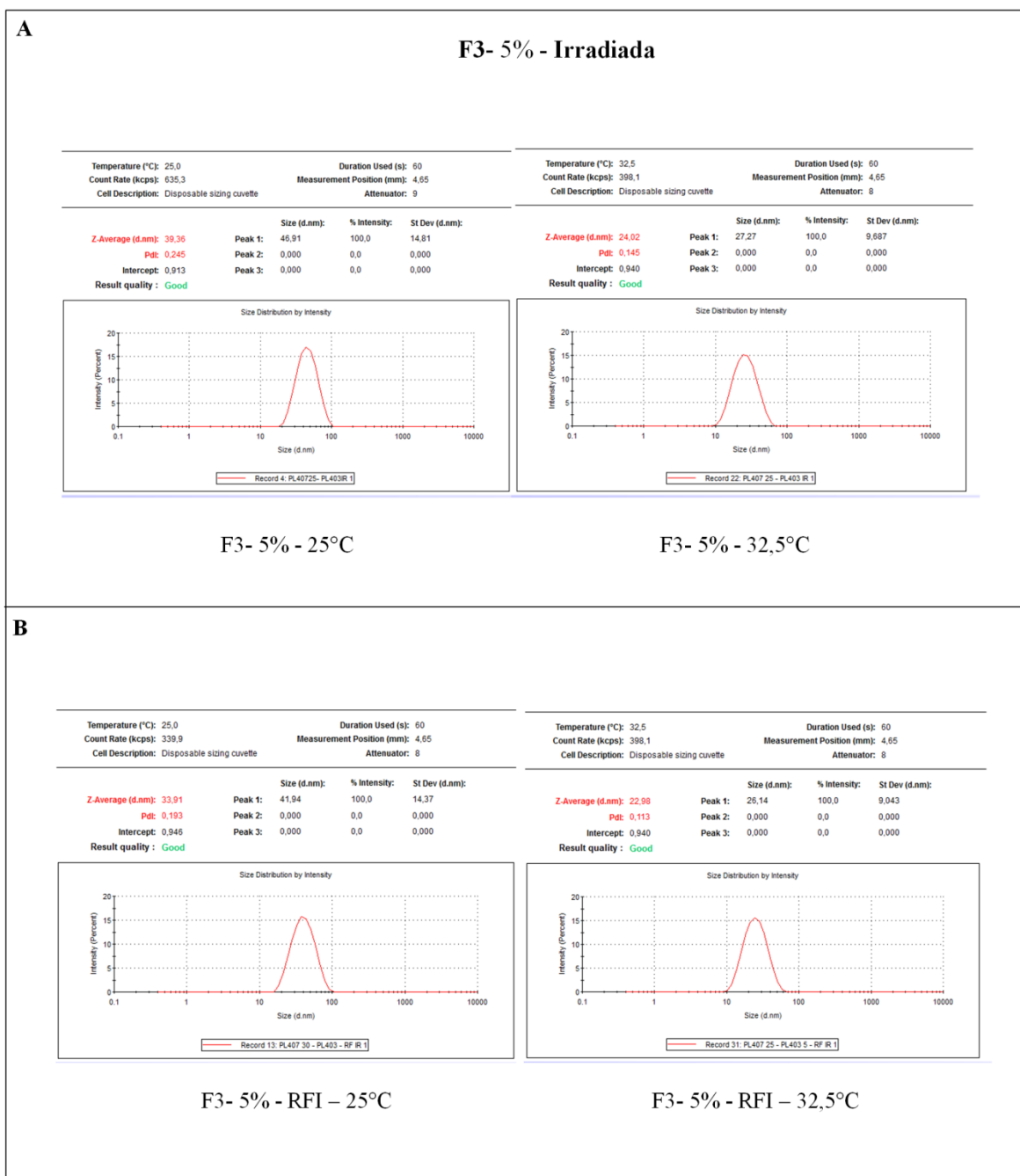


Figura 5: Distribuição do diâmetro médio micelar para o sistema binário F3- 5%, após Irradiação com luz UV por 30 min. (A) Experimento realizado a 25°C e 32,5°C e (B) após incorporação de RF a 25°C e 32,5°C. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

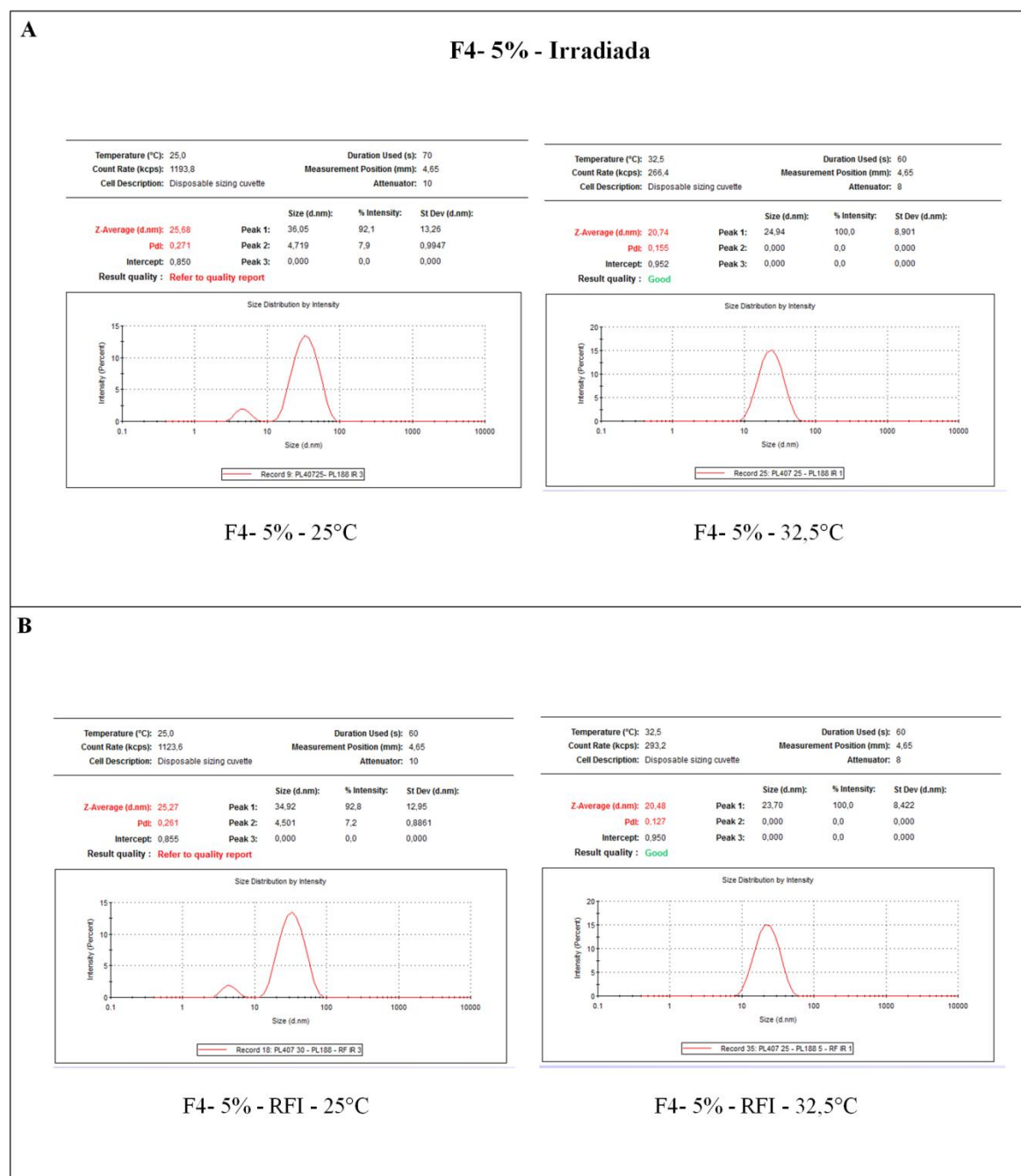


Figura 6: Distribuição do diâmetro médio micelar para o sistema binário F4- 5%, após Irradiação com luz UV por 30 min. (A) Experimento realizado a 25°C e 32,5°C e (B) após incorporação de RF a 25°C e 32,5°C. Concentração final da formulação de 5%, após diluição em H₂O. (n=3)

Anexo I.I - Termogramas adquiridos por CDE, representando a termorreversibilidade do processo de micelização para as formulações a base de Pluronic.

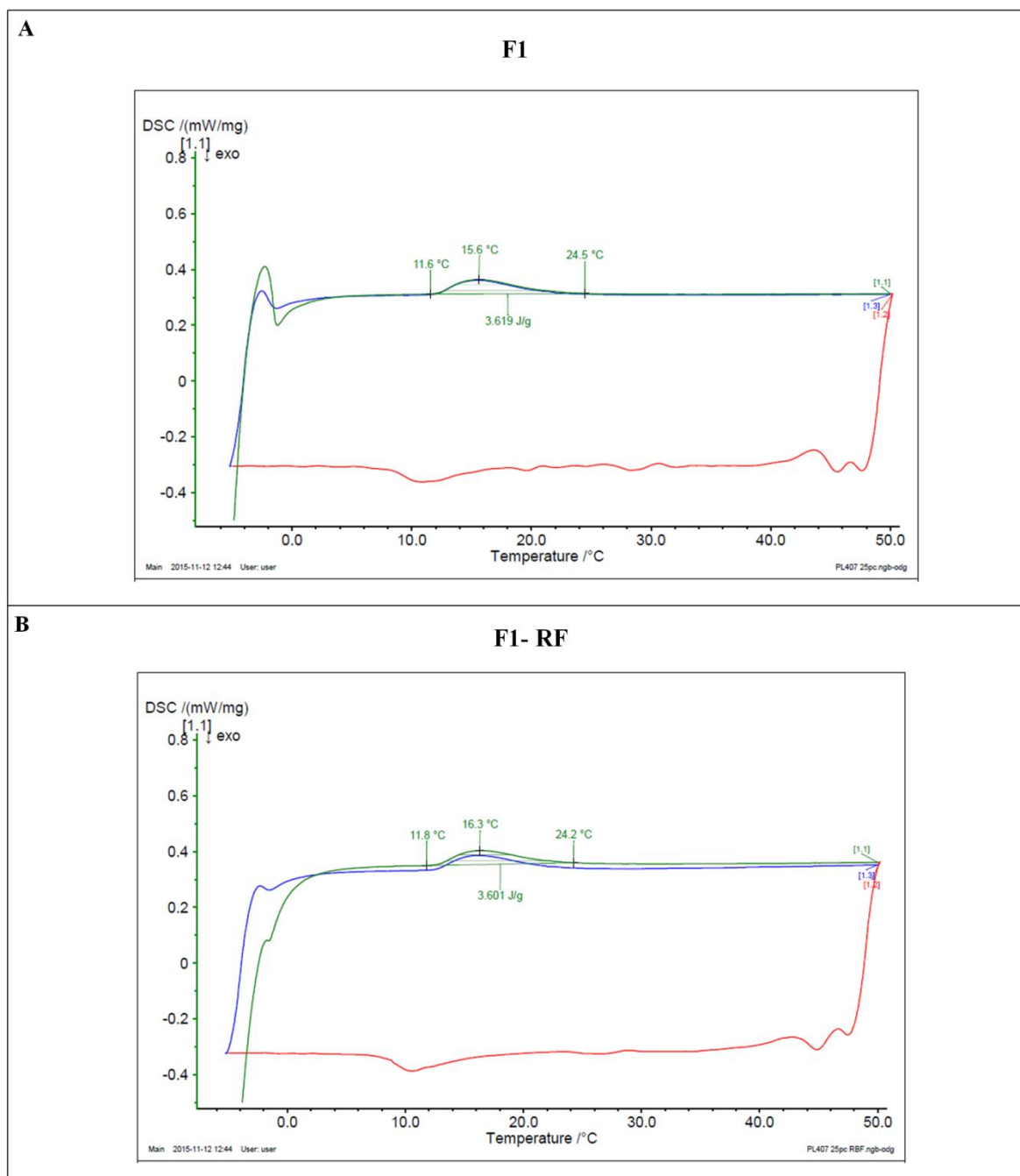
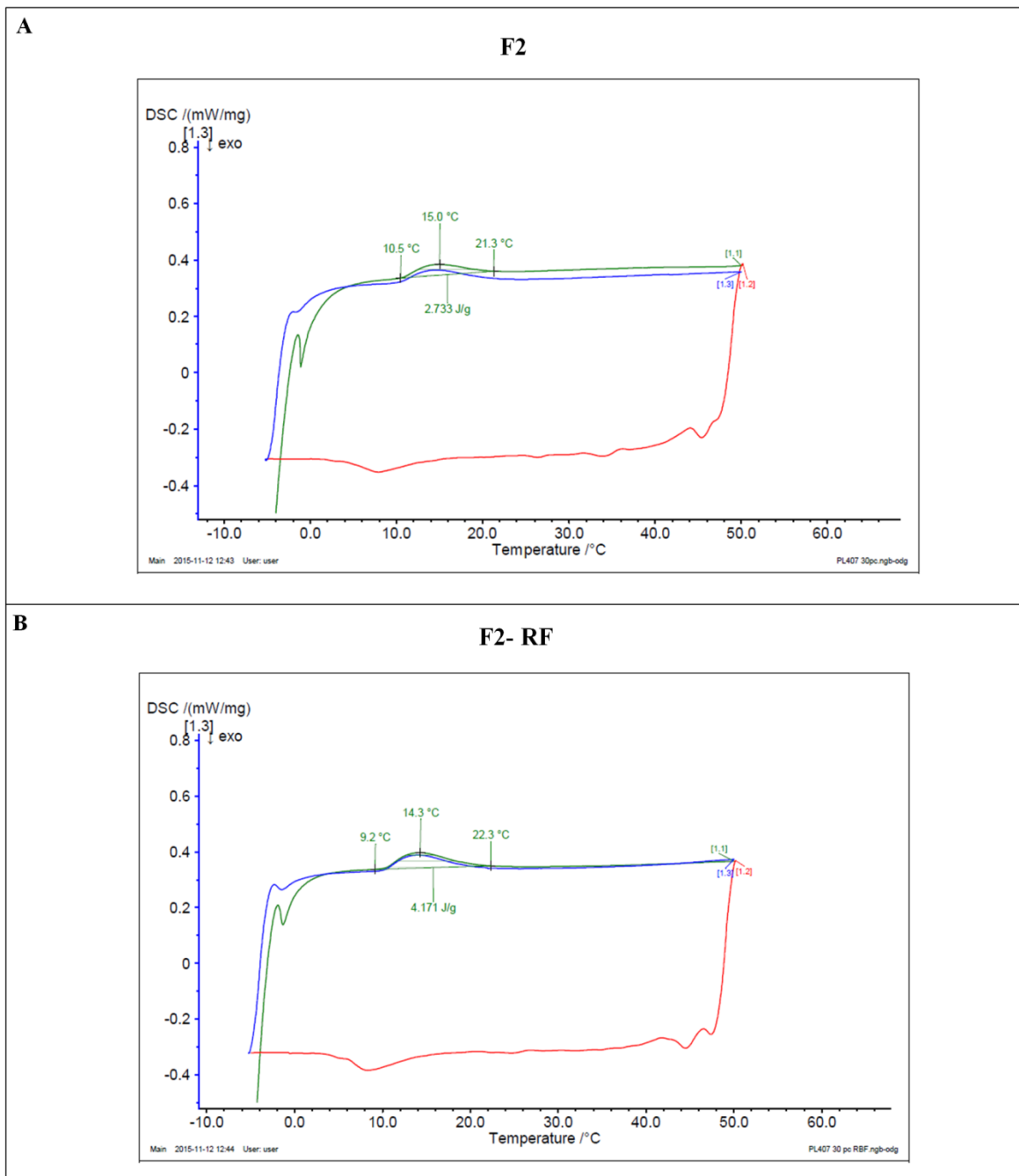


Figura 7: Termograma representando a termorreversibilidade, processo de micelização, do sistema isolado F1. (A) e do sistema composto por RF- F1 (B). [Ciclo 1: 0-50°C (Verde); ciclo 2: 50- 0°C (Vermelho) e ciclo 3: 0-50°C (Azul)].



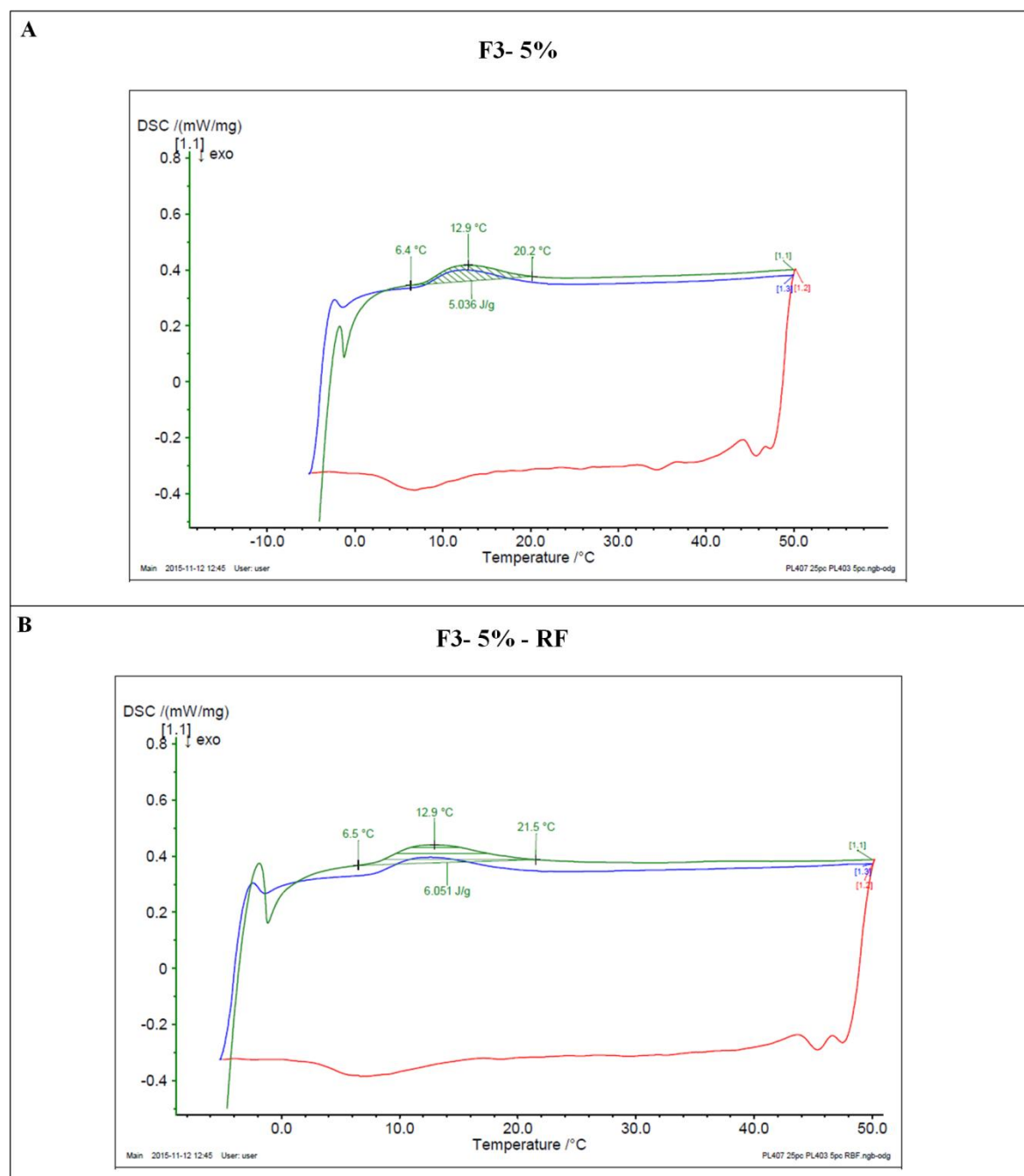


Figura 9: Termograma representando a termorreversibilidade, processo de micelização, do sistema binário F3. (A) e do sistema composto por RF- F3 (B). [Ciclo 1: 0-50°C (Verde); ciclo 2: 50- 0°C (Vermelho) e ciclo 3: 0-50°C (Azul)].

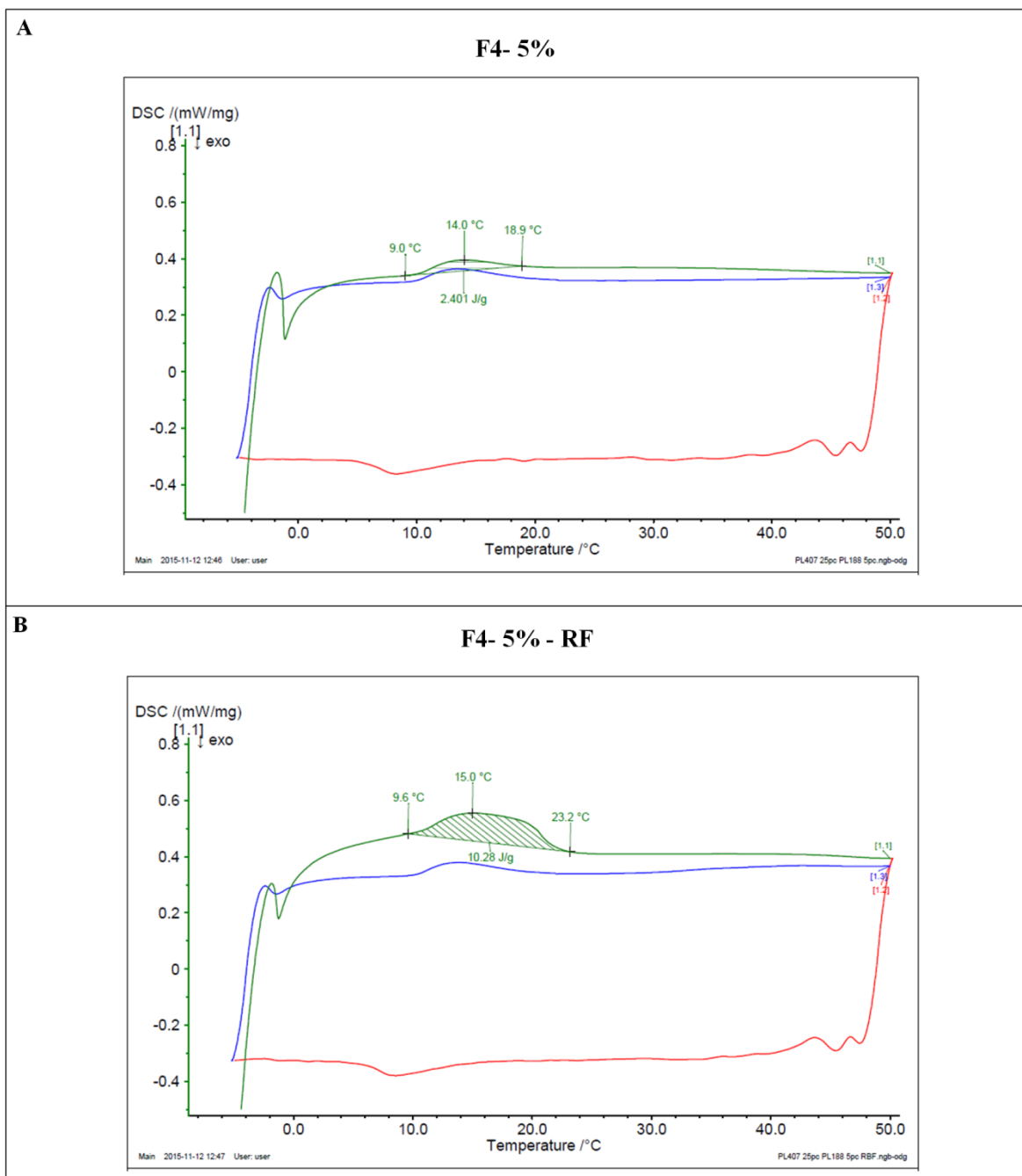


Figura 10: Termograma representando a termorreversibilidade, processo de micelização, do sistema binário F4. (A) e do sistema composto por RF- F4 (B). [Ciclo 1: 0-50°C (Verde); ciclo 2: 50- 0°C (Vermelho) e ciclo 3: 0-50°C (Azul)].

Formulações Irradiadas

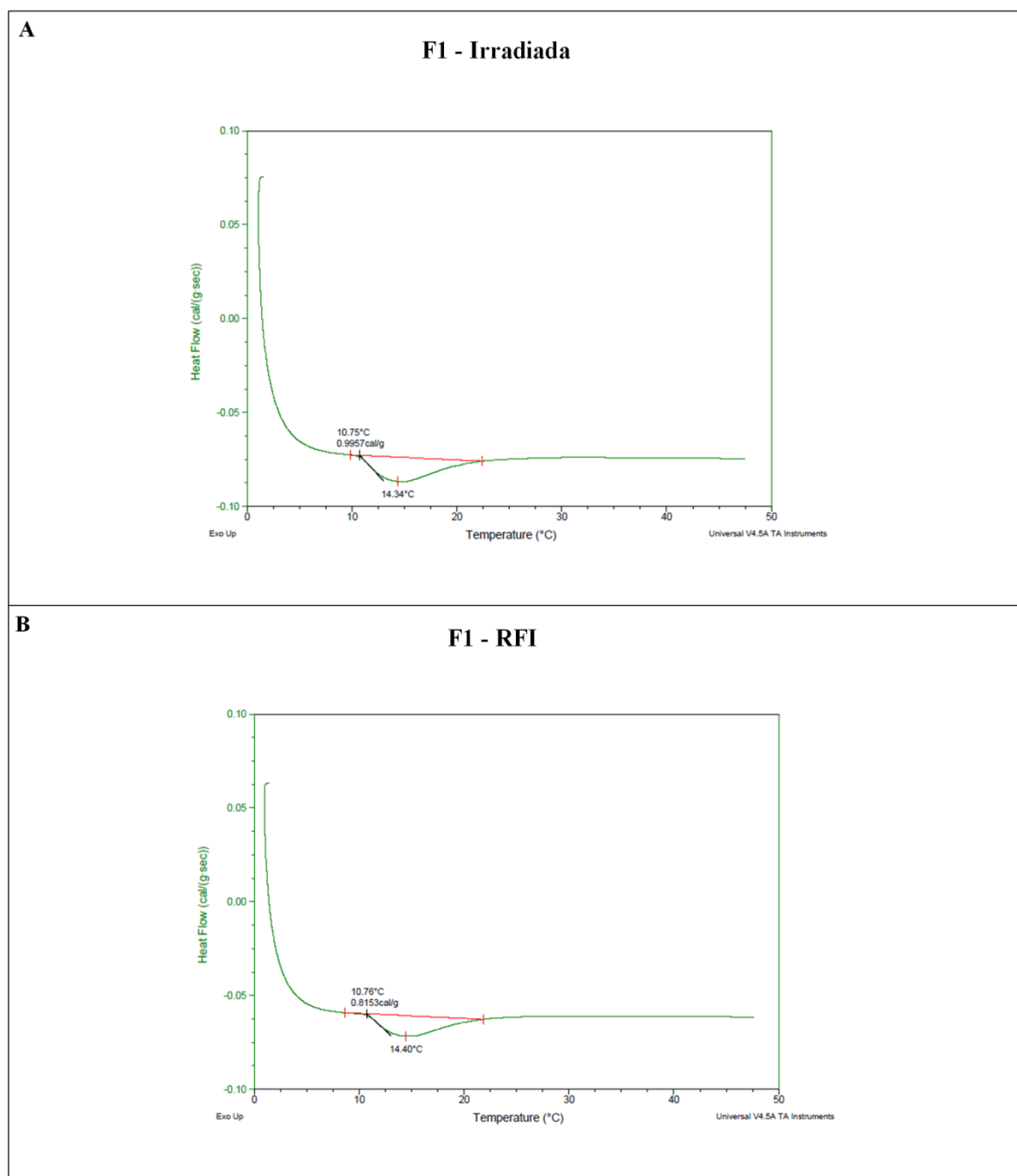


Figura 11: Termograma representando a termorreversibilidade, processo de micelização, do sistema isolado F1, após Irradiação com luz UV por 30min. (A) e do sistema composto por RF- F1 (B). [Ciclo 1: 0-50°C (Verde); ciclo 2: 50- 0°C (Vermelho) e ciclo 3: 0-50°C (Azul)].

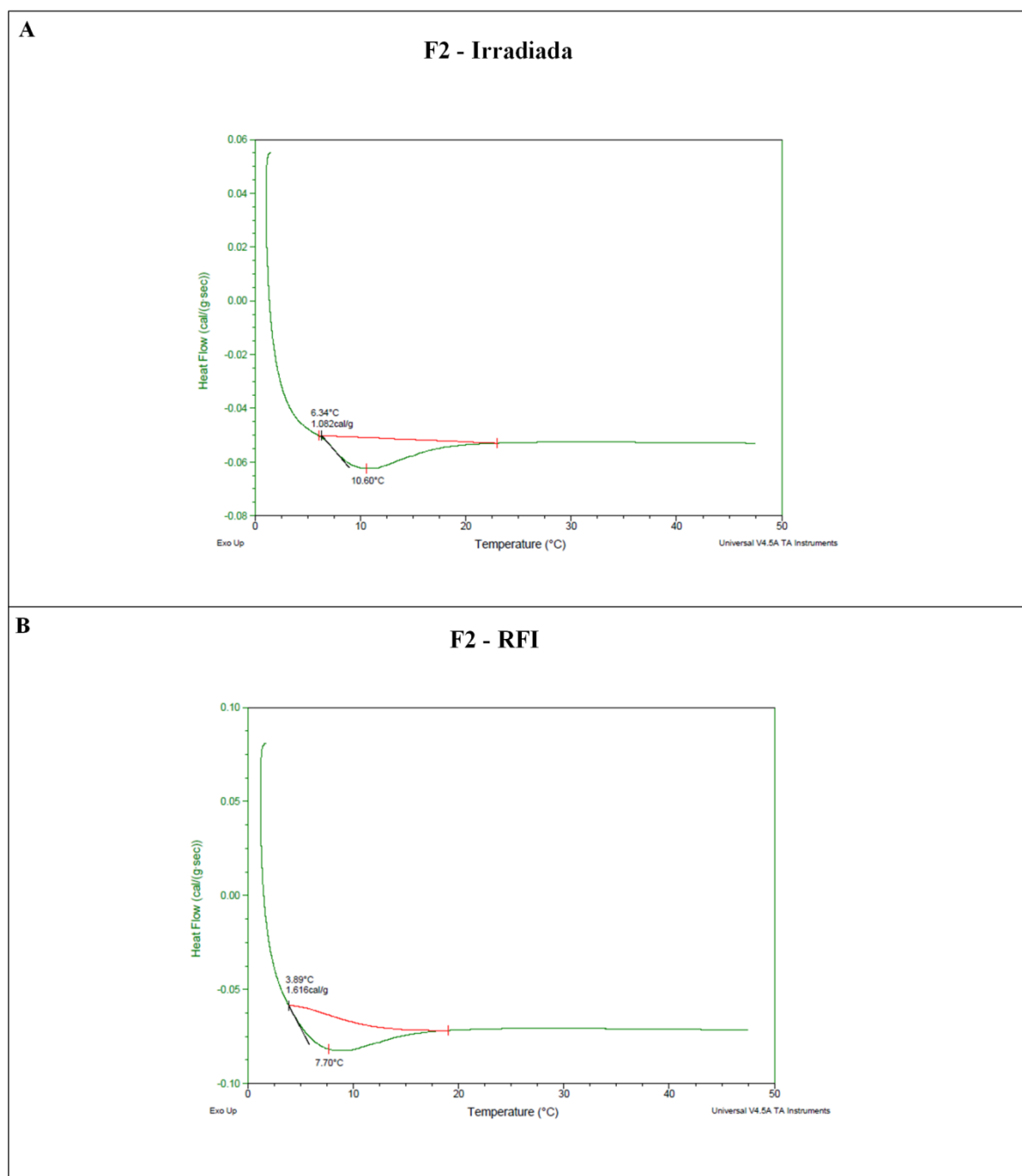


Figura 12: Termograma representando a termorreversibilidade, processo de micelização, do sistema isolado F2, após Irradiação com luz UV por 30min. (A) e do sistema composto por RF- F2 (B). [Ciclo 1: 0-50°C (Verde); ciclo 2: 50- 0°C (Vermelho) e ciclo 3: 0-50°C (Azul)].

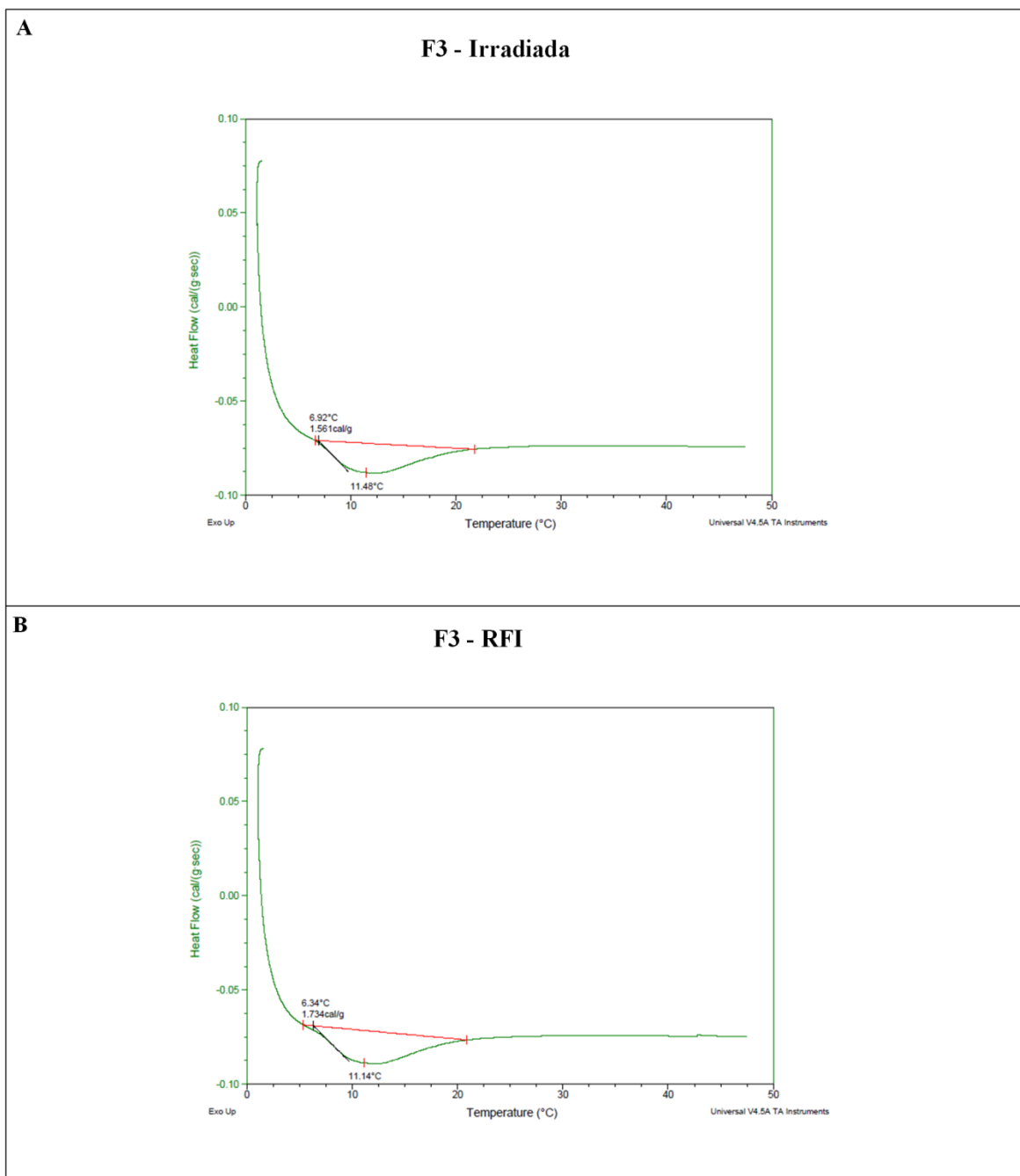


Figura 13: Termograma representando a termorreversibilidade, processo de micelização, do sistema binário F3, após Irradiação com luz UV por 30min. (A) e do sistema composto por RF- F3 (B). [Ciclo 1: 0-50°C (Verde); ciclo 2: 50- 0°C (Vermelho) e ciclo 3: 0-50°C (Azul)].

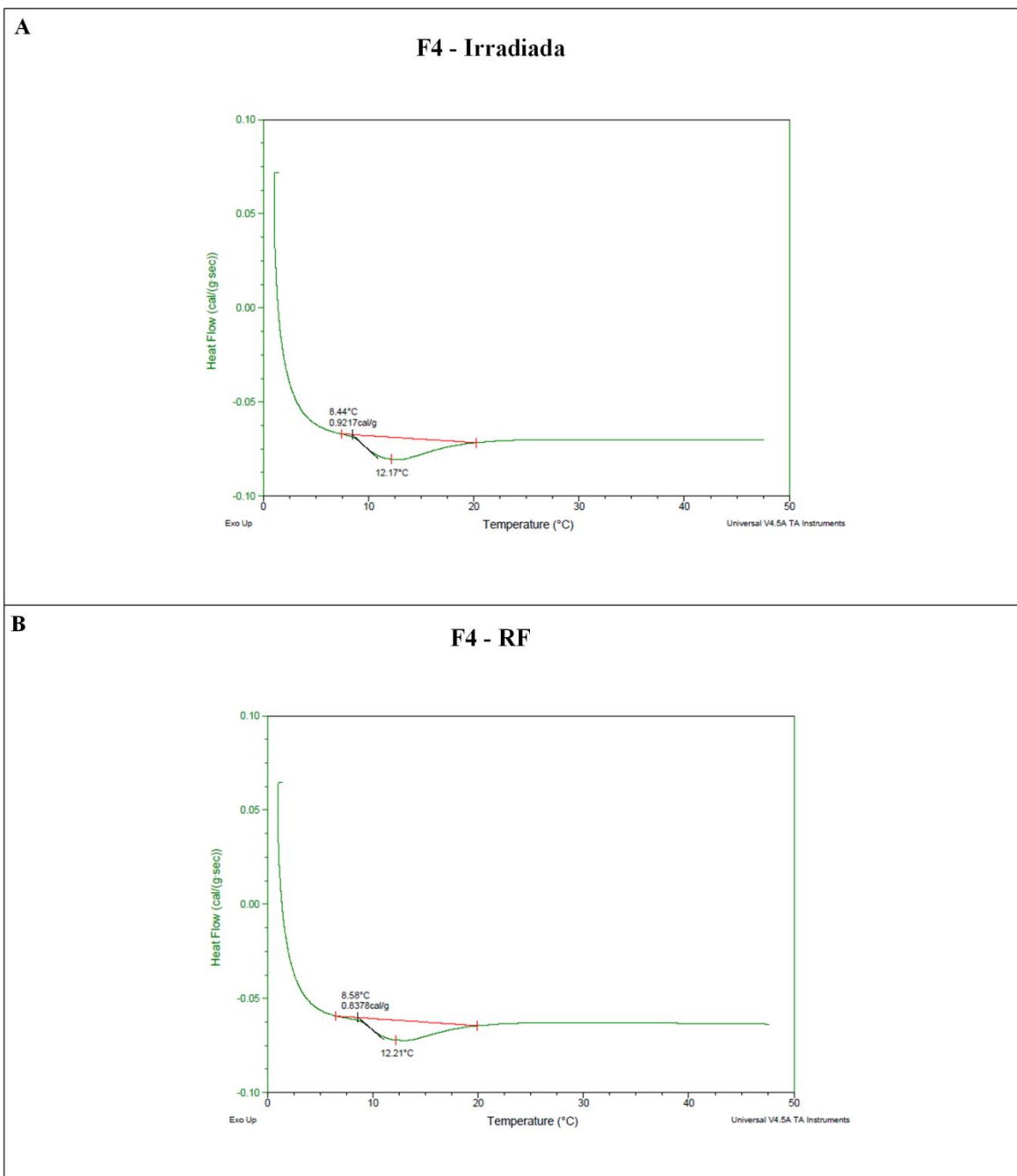


Figura 14: Termograma representando a termorreversibilidade, processo de micelização, do sistema binário F4, após Irradiação com luz UV por 30min. (A) e do sistema composto por RF- F4 (B). [Ciclo 1: 0-50°C (Verde); ciclo 2: 50- 0°C (Vermelho) e ciclo 3: 0-50°C (Azul)].

Anexo I.II – Reogramas adquiridos por Reologia, representando comportamento reológico, cinética de termogelificação, das formulações a base de Pluronic.

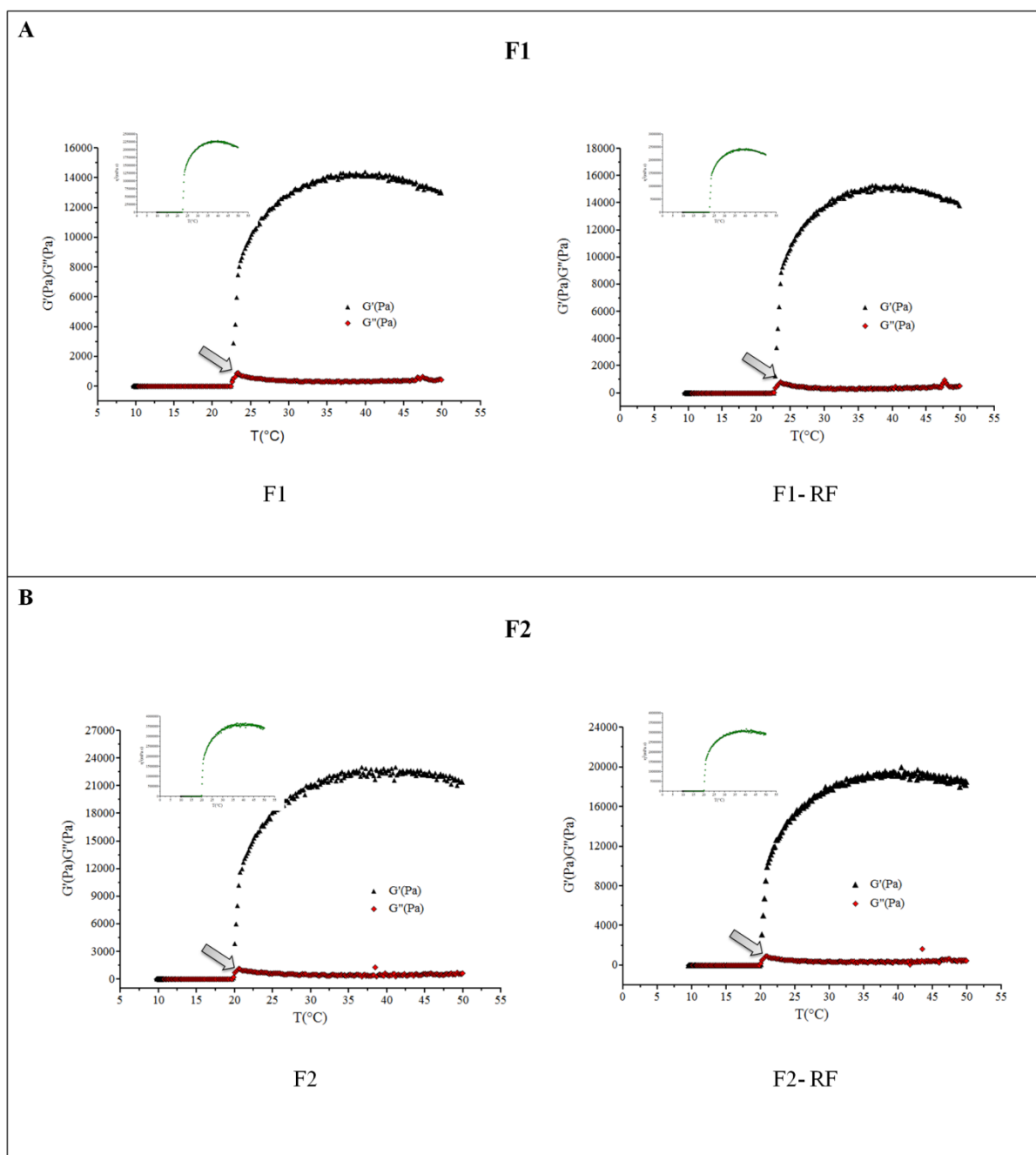


Figura 15: A- Representação dos Reogramas para os sistemas isolados F1; B- F2, com e sem a incorporação de RF. Em ambos fixou-se a frequência em 1Hz e variou-se a temperatura T_{inicial} 10° e T_{final} 50°C (n=3). Seta indica a T_{gel} .

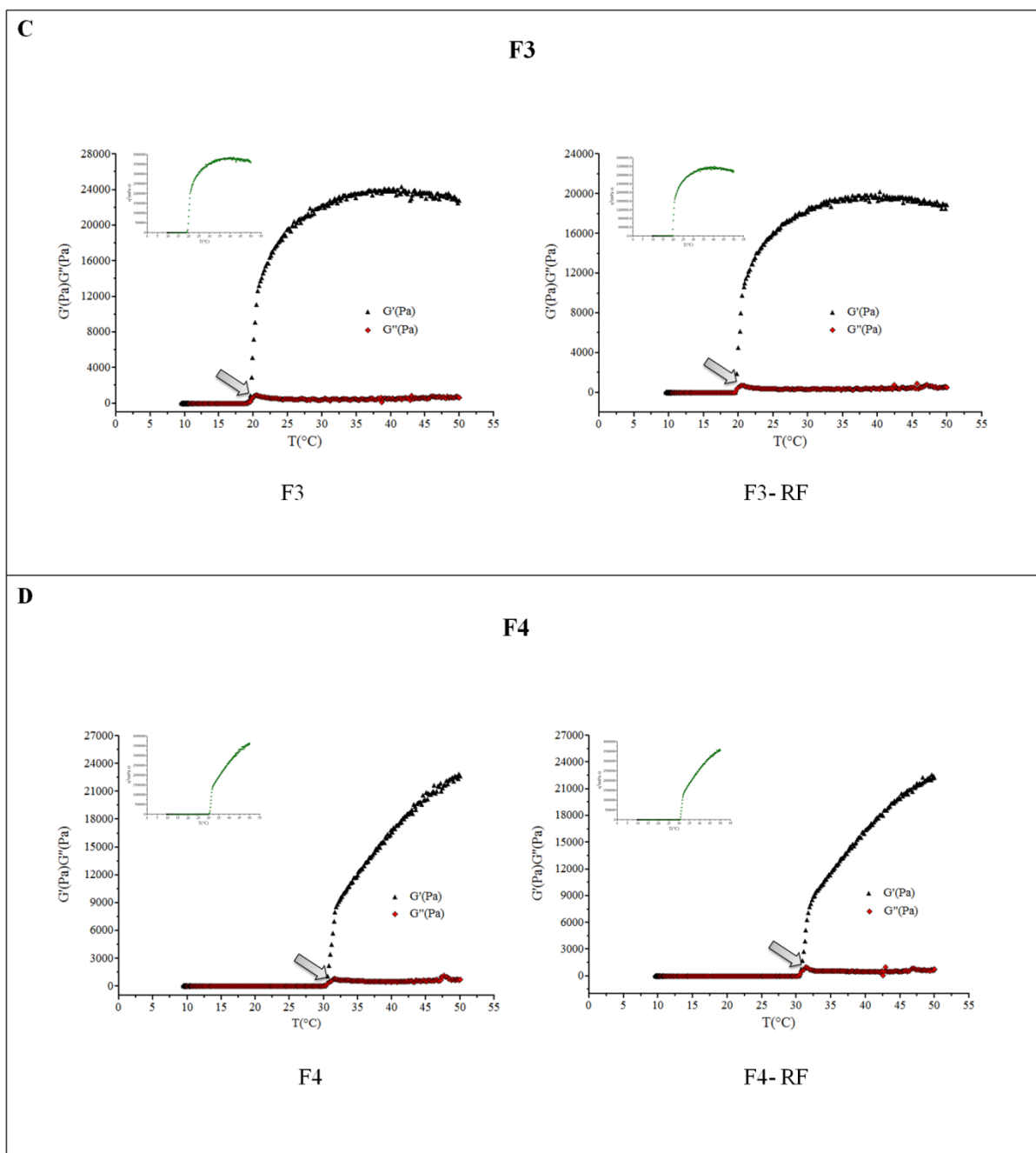


Figura 16: C- Representação dos Reogramas para os sistemas binários F3; D- F4, com e sem a incorporação de RF. Em ambos fixou-se a frequência em 1Hz e variou-se a temperatura T_{inicial} 10° e T_{final} 50°C ($n=3$). Seta indica a T_{gel} .

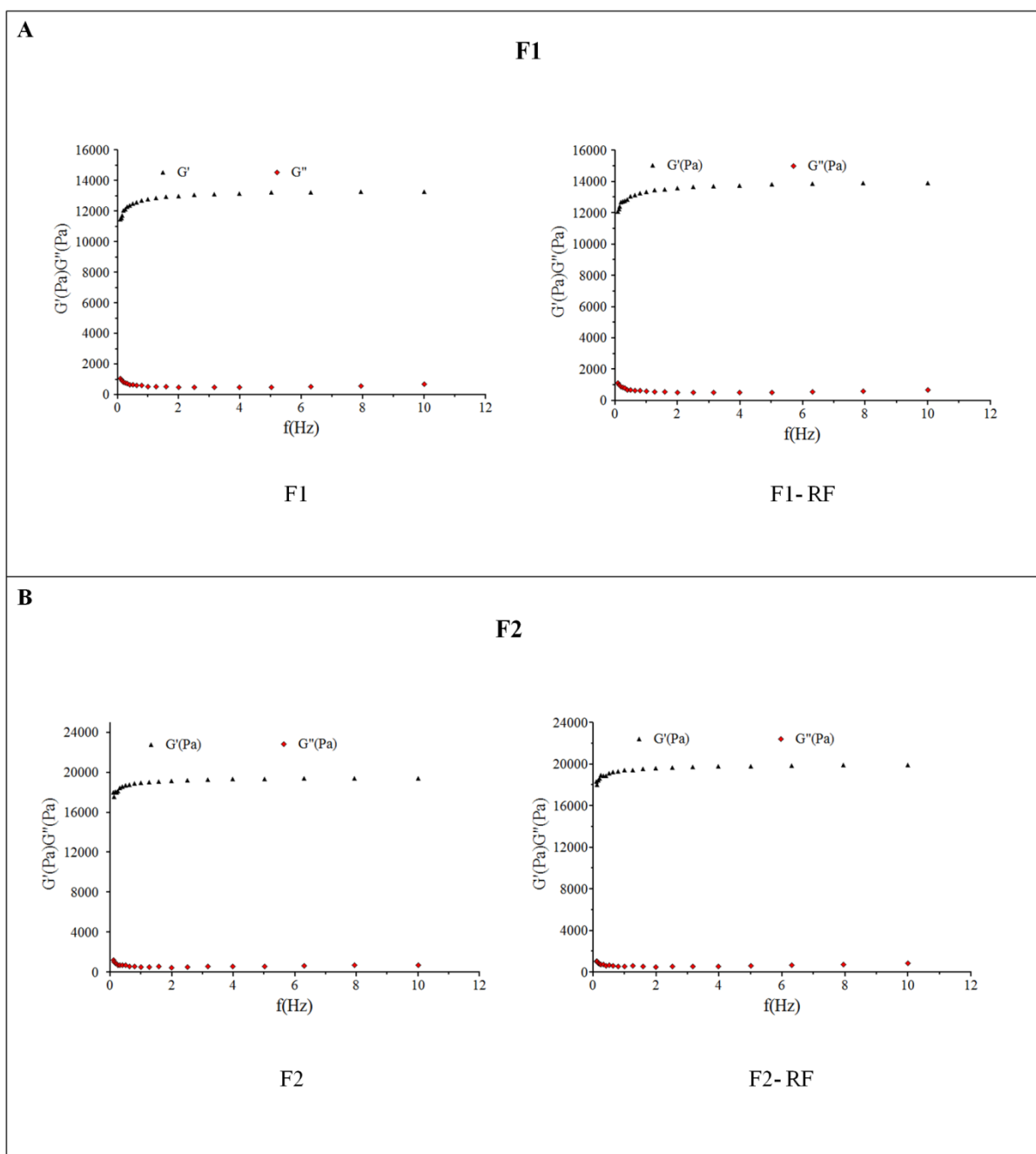


Figura 17: A- Representação dos Reogramas para os sistemas isolados F1; B- F2, com e sem a incorporação do fármaco. Em ambos fixou-se a Temperatura em 32,5°C e variou-se Frequência 0,1- 1Hz (n=3).

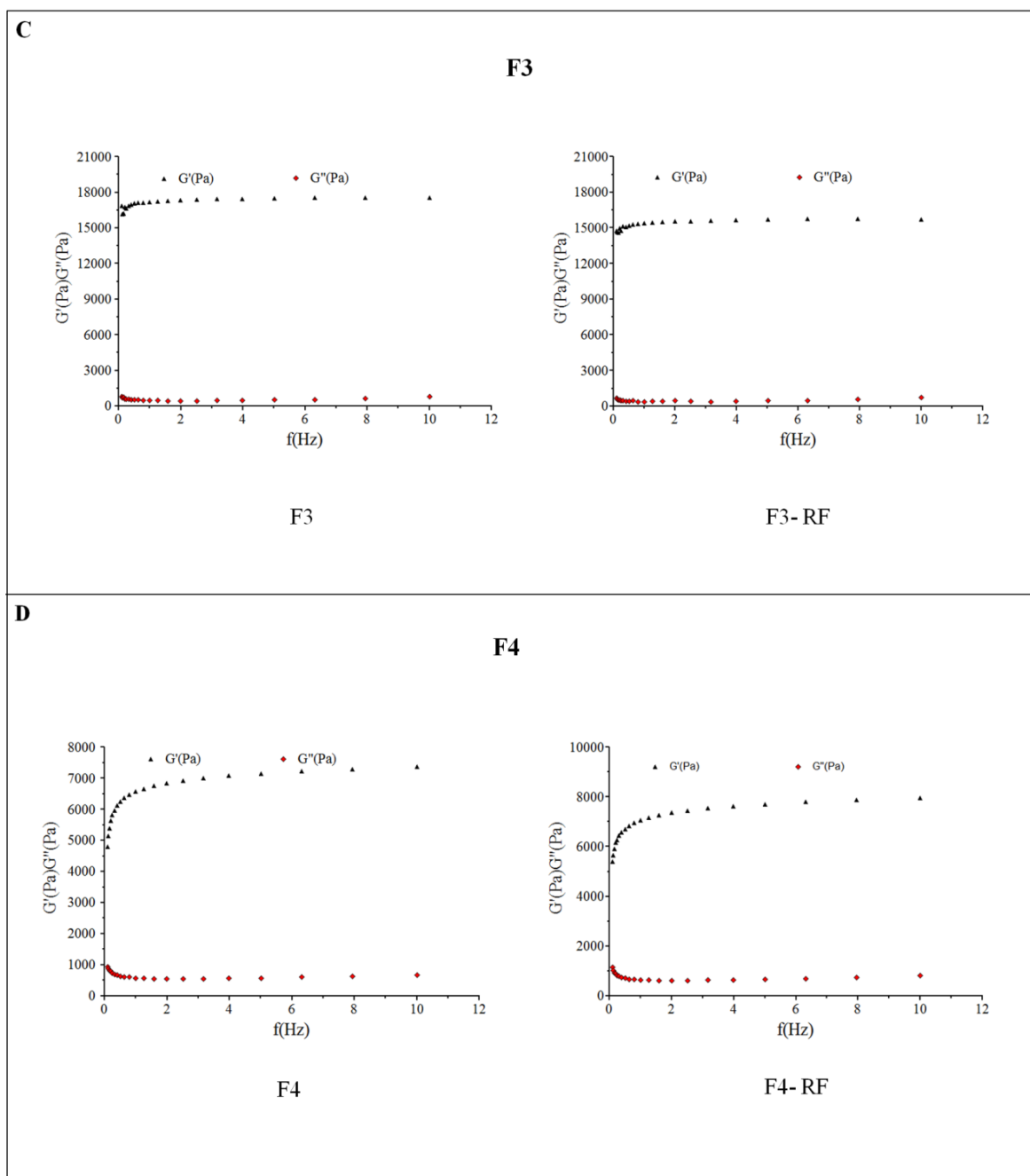


Figura 18: A- Representação dos Reogramas para os sistemas binários F3; B- F4, com e sem a incorporação do fármaco. Em ambos fixou-se a Temperatura em 32,5°C e variou- se Frequência 0,1- 1Hz (n=3).

Formulações Irradiadas

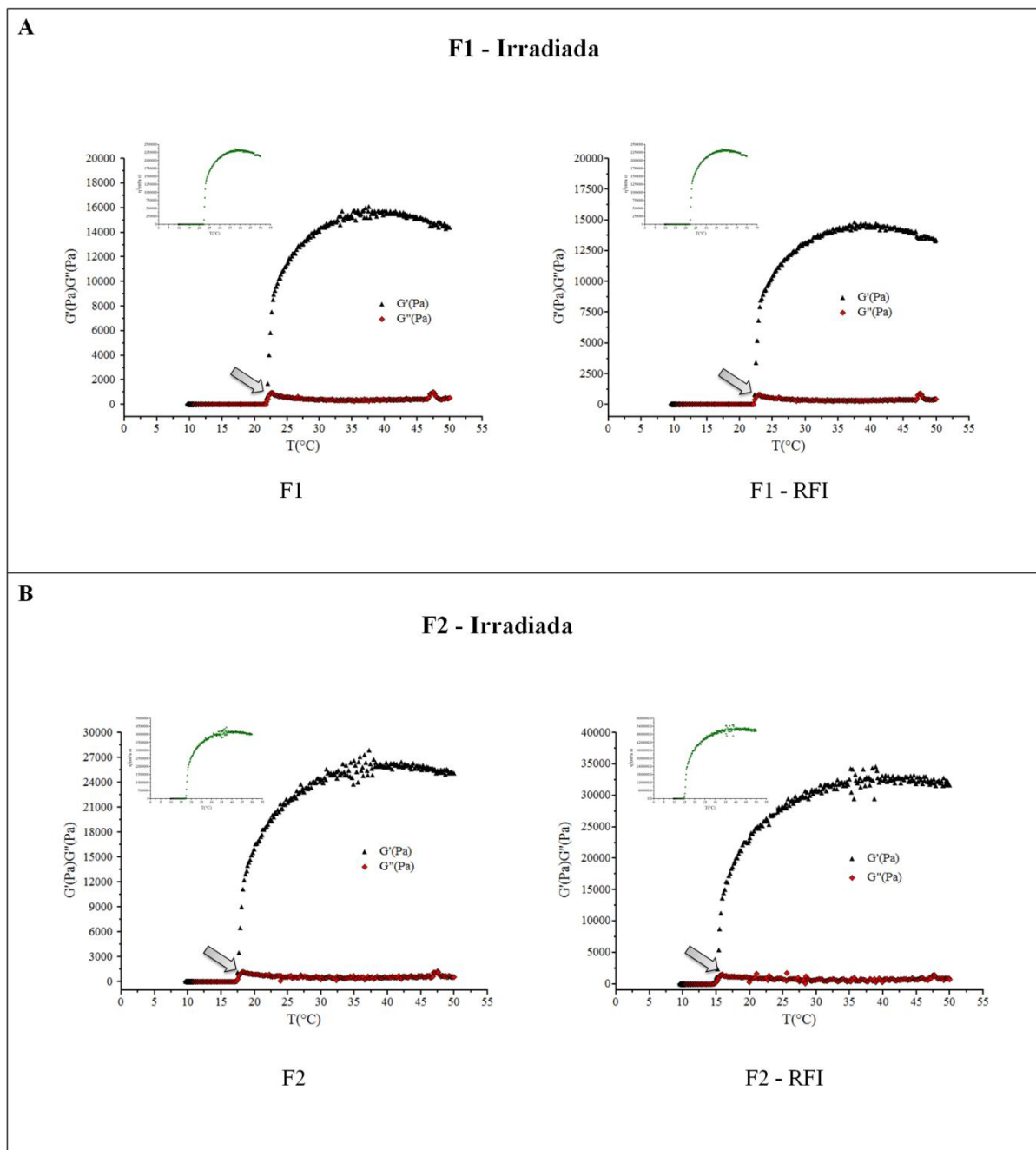


Figura 19: A- Representação dos Reogramas para os sistemas isolados F1; B- F2, com e sem a incorporação de RF, após Irradiação com luz UV por 30 min. Em ambos fixou-se a frequência em 1Hz e variou-se a temperatura $T_{inicial}$ 10° e T_{final} 50°C (n=3). Seta indica a Tgel.

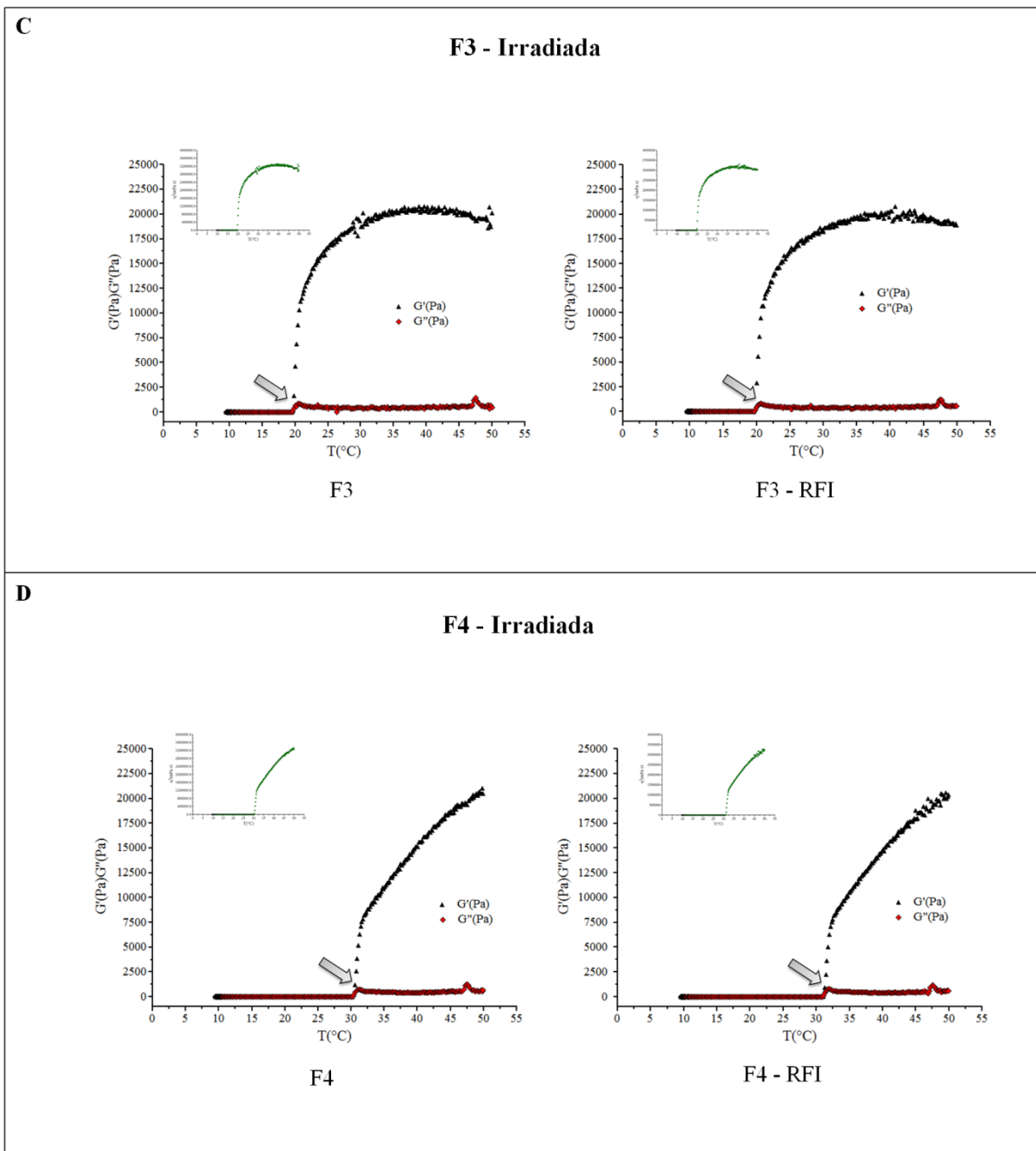


Figura 20: A- Representação dos Reogramas para os sistemas binários F3; B- F4, com e sem a incorporação de RF, após Irradiação com luz UV por 30 min. Em ambos fixou-se a frequência em 1Hz e variou-se a temperatura T_{inicial} 10° e T_{final} 50°C ($n=3$). Seta indica a Tgel.

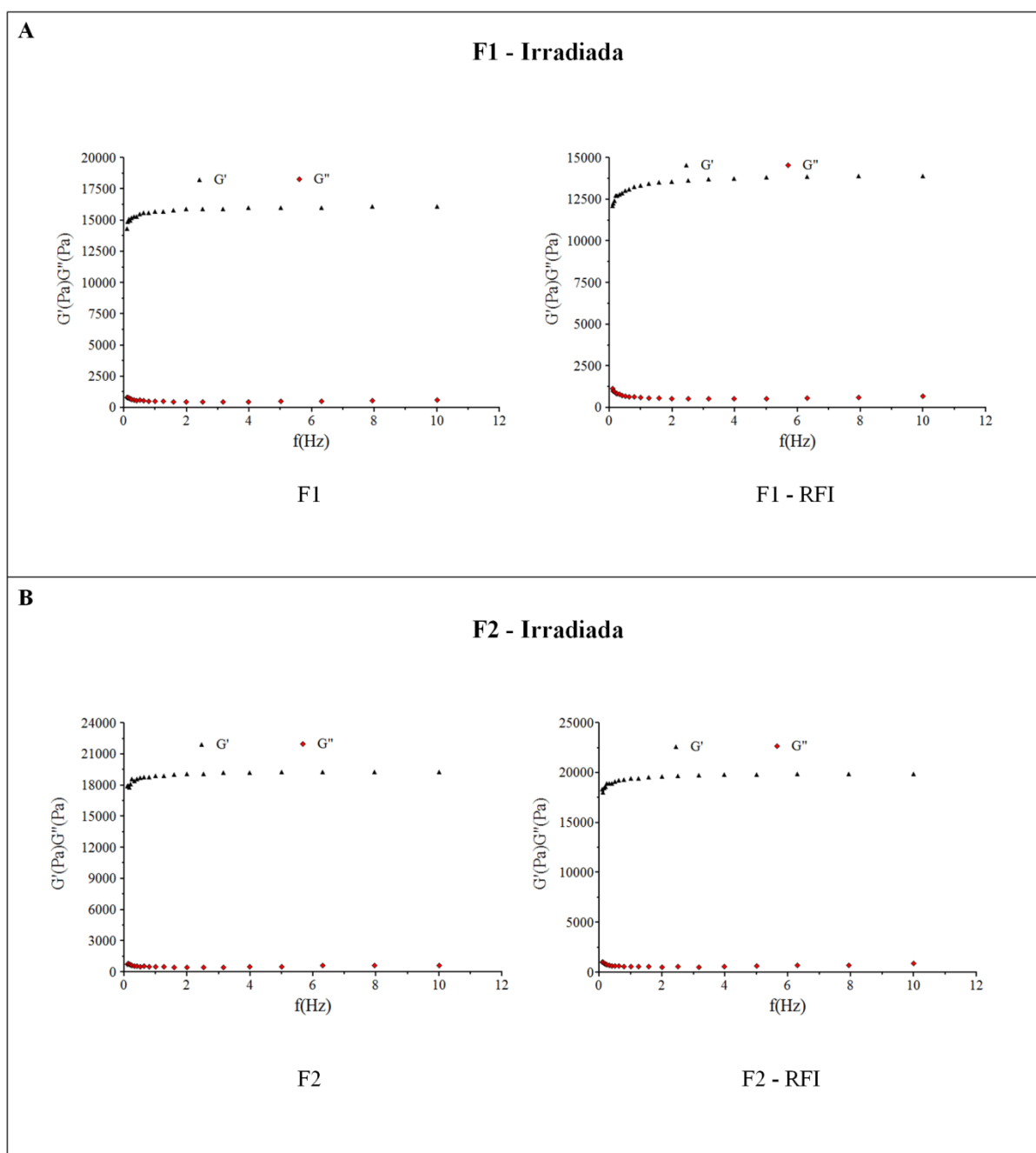


Figura 21: A- Representação dos Reogramas para os sistemas isolados F1; B- F2, com e sem a incorporação de RF, após Irradiação com luz UV por 30 min. Em ambos fixou-se a Temperatura em 32,5°C e variou-se Frequência 0,1- 1Hz (n=3).

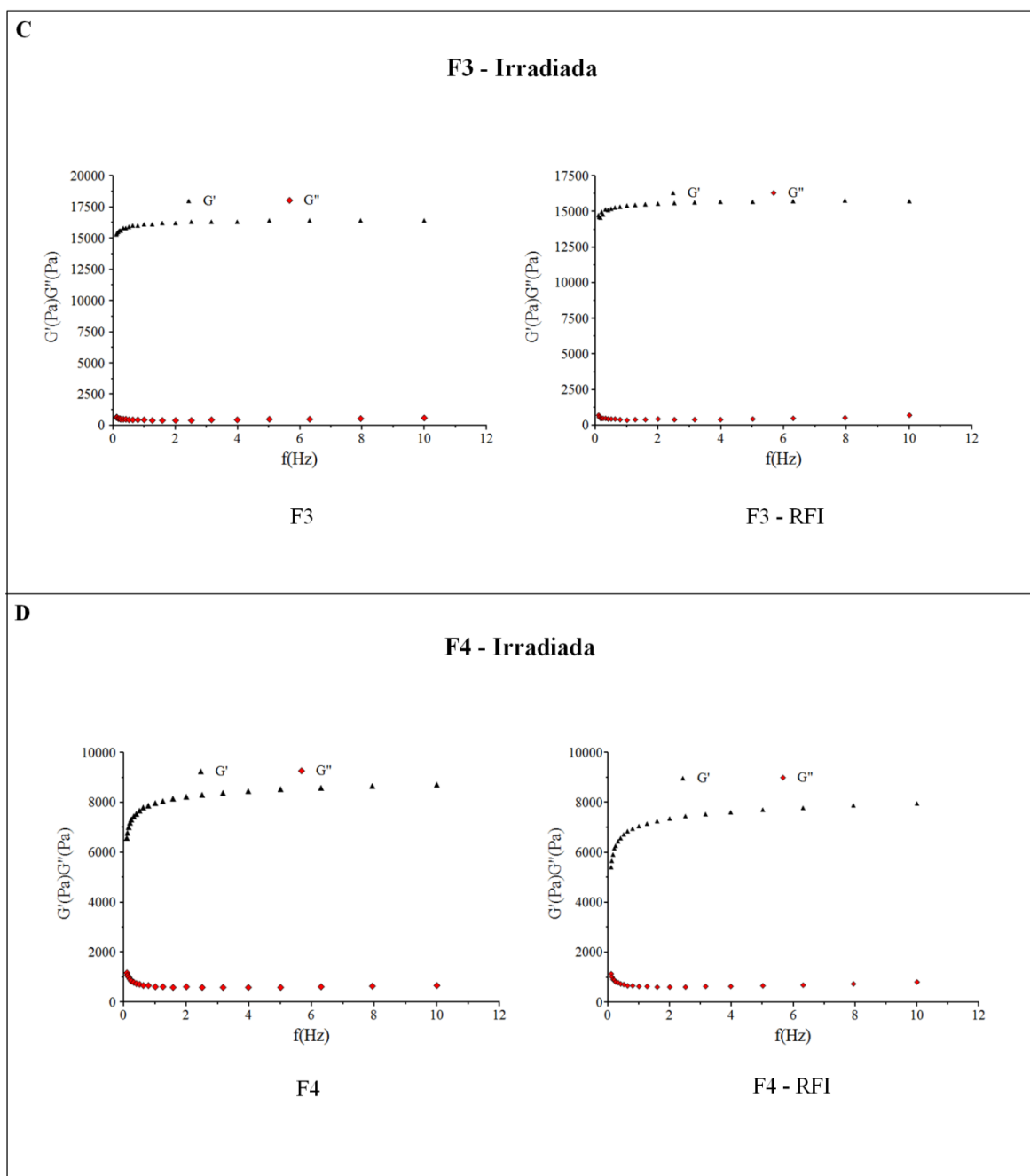


Figura 22: A- Representação dos Reogramas para os sistemas binários F3; B- F4, com e sem a incorporação de RF, após Irradiação com luz UV por 30 min. Em ambos fixou-se a Temperatura em 32,5°C e variou-se Frequência 0,1- 1Hz (n=3).

Anexo II

Anexo II.I – Documento de Bioética e/ou Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada ***“Desenvolvimento de formulação farmacêutica para uso tópico: responsividade de linhagens celulares de melanoma humano.”***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Marina Pereira Dias
Nome do(a) aluno(a): Marina Pereira Dias

Assinatura: Carmen Veríssima
Nome do(a) orientador(a): Profª Dra Carmen Veríssima Ferreira-Halder

Data: 30/05/2017

Anexo II.II – Declaração de Direitos Autorais**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Desenvolvimento de formulação farmacêutica para uso tópico: responsividade de linhagens celulares de melanoma humano.**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de Maio de 2017

Assinatura : Marina P. Dias

Nome do(a) autor(a): **Marina Pereira Dias**

RG n.º 33799900-4

Assinatura : Carmen Veríssima

Nome do(a) orientador(a): **Profª Dra Carmen Veríssima Ferreira-Halder**

RG n.º 562820577